

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: FISILOGIA

Luciana Abreu da Rosa

*Papel da testosterona e da epitestosterona na regulação hormonal do processo de maturação  
testicular*

Porto Alegre

2020

Luciana Abreu da Rosa

*Papel da testosterona e da epitestosterona na regulação hormonal do processo de maturação testicular*

Tese apresentada ao Programa de Pós- Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do título de doutora em Fisiologia.

Orientadora: Profª Drª Eloísa da Silveira Loss

Coorientador: Prof. Dr. Luciano Stürmer de Fraga

Porto Alegre

2020

*“Trabalhe com o que você ama e nunca mais precisará trabalhar na vida.”*  
*Confúcio*

## AGRADECIMENTOS

À professora Eloísa Loss e ao professor Luciano Stürmer de Fraga pela oportunidade, confiança, incentivo, dedicação, paciência, compreensão, cuidado... Vocês foram minha célula de Sertoli me provendo suporte físico, estrutural e mental para chegar até aqui. Não tenho palavras para expressar minha gratidão...

Ao professor Guillermo Federico Wasserman pelo legado científico e estrutural.

Ao professor Marcelo Goldani e a professora Mariana Bohns Michalowski pela parceria, confiança e por abrirem as portas do Laboratório de Pediatria Translacional (LPT) para a execução do estudo.

À Unidade de Experimentação Animal do HCPA por fornecer a estrutura para a execução dos experimentos e aos funcionários, especialmente à enfermeira Marta Justina Giotti Cioato, pelo auxílio na condução dos experimentos e pelo cuidado com os animais.

À Unidade de Pesquisa Experimental, ao Centro de Terapia Gênica, ao Laboratório de Cardiologia, ao Laboratório de Patologia e ao Serviço de Endocrinologia do HCPA por fornecerem a estrutura para a execução das análises e aos funcionários pela constante disposição em ajudar.

Ao CREAL, em especial à veterinária Fernanda Mello e ao Joel.

Aos professores do PPGCB: Fisiologia pela oportunidade, em especial o professor Guilherme Baldo pela compreensão e ao secretário Diego sempre disposto a ajudar.

Às professoras Maria Flavia Marques Ribeiro, Fátima Regina Mena Barreto da Silva e professor Alexandre Luz de Castro pelas valiosas contribuições.

Ao CNPq, PROPESQ-UFRGS e HCPA pelo apoio financeiro.

Aos meus pais por sempre me apoiarem e me incentivarem.

Aos colegas do LABENEX e do LPT pela amizade, parceria, auxílio e incentivo.

Ao meu “desorientador”, Gustavo Escott, pela amizade, parceria e ajuda.

À Rajla Bressan pela amizade, pela ajuda imensurável em todos os momentos e pela parceria nas madrugadas de experimento.

À Isadora Tassinari por me socorrer inúmeras vezes, pela amizade e orientações nutricionais.

À Isabel Werlang que foi minha segunda mãe científica.

À Caroline Cabreira, Carolina Pacheco, Ciliana Rechenmacher, Daniela Kretzer, Isabel Werlang, Monique Hahn e Salete Matos pela ajuda, torcida, amizade, momentos de descontração e terapia em grupo.

À Alice e Tatiane Flores, Cristiane dos Santos, amigas do Clube de Literatura Online, e família pelo carinho, incentivo e por entenderem a minha ausência.

Ao Alexandre Coelho pelo cuidado e suporte para sobreviver até aqui.

## RESUMO

A testosterona e seu 17- $\alpha$  epímero, a epitestosterona, apresentam um efeito não clássico/rápido com a ativação de cascatas de sinalização intracelulares, além de seus efeitos clássicos/lentos sobre o receptor intracelular de andrógenos (iAR). As ações destes andrógenos têm papel fundamental sobre os fatores que desencadeiam as alterações da fase proliferativa para a fase de maturação das células de Sertoli. Este processo é essencial para o sucesso da espermatogênese e fertilidade normal no adulto. O objetivo deste trabalho é investigar as diferenças entre os efeitos da testosterona e da epitestosterona em ratos Wistar normais e quimicamente castrados. O efeito destes hormônios também foi testado durante a inibição das vias dependentes de iAR, na presença do antiandrógeno, flutamida. Os ratos foram castrados quimicamente no 5º dia pós-natal (dpn) com a aplicação de EDS (Etano-1,2-dimetilsulfonato), um agente citotóxico que promove a apoptose das células de Leydig, reduzindo os níveis dos andrógenos. Após, os animais receberam reposição com testosterona ou epitestosterona e foram tratados ou não com flutamida, do 6º dpn até o 13º ou 20º dpn e, posteriormente eutanasiados no final da fase proliferativa, no 14º e na fase de maturação, no 21º dpn. Os animais tratados com epitestosterona e flutamida apresentaram menor crescimento corporal. O peso do epidídimo também foi reduzido nos animais tratados com epitestosterona e flutamida. Somente o tratamento com flutamida diminuiu o peso do epidídimo nas duas idades testadas (14º e 21º dpn). O peso testicular e a razão entre o peso testicular e o peso corporal foram reduzidos nos animais castrados, assim como a flutamida reduziu este peso nos animais que receberam reposição com testosterona. A administração de EDS provocou redução nos níveis de RNAm tanto do AMH (hormônio anti-Mülleriano) como de seu receptor AMHR2, nos animais no 14º dpn. Nos testículos de animais tratados com flutamida, a epitestosterona reduziu o AMH e tanto a reposição com testosterona como com epitestosterona diminuíram a expressão do RNAm de AMHR2 no 14º dpn. A castração com EDS diminuiu a expressão do iAR e a reposição com os andrógenos não modificou este efeito nos testículos dos ratos no 21º dpn. Entre os ratos tratados com flutamida, somente os que receberam reposição de testosterona e epitestosterona tiveram a expressão do iAR reduzida. Foi observado um aumento da expressão da conexina-43 nos animais tratados com epitestosterona sem flutamida, enquanto, em ratos tratados com flutamida, os dois hormônios não foram efetivos em produzir um aumento da expressão da conexina-43 reduzida pelo EDS. Nossos resultados sugerem que a epitestosterona apresenta um efeito antiandrogênico sobre os tecidos que são sensíveis aos andrógenos, como o epidídimo. Entretanto, os efeitos da testosterona e da epitestosterona nos parâmetros de desenvolvimento testiculares apesar de semelhantes podem ser mediados por mecanismos distintos. O peso testicular, a expressão do AMH, e o conteúdo proteico do iAR foram regulados pelo mecanismo de ação não clássico independente do iAR. A expressão do AMHR2 e o conteúdo proteico do AMHR2 e da Cx43 foram modulados pelo mecanismo de ação clássico ou não clássico dependente de iAR. O AMH parece modular o balanço da ação da testosterona e da epitestosterona, essencial para o desenvolvimento e a maturação testicular.

## ABSTRACT

Testosterone and its 17- $\alpha$  epimer, epitestosterone, are described as having rapid/non-classical effects in addition to their slow/classical androgen actions via the intracellular androgen receptor (iAR). The actions of these androgens play an essential role in triggering factors that shift Sertoli cells from the proliferation phase to the maturation phase. This process is essential for successful spermatogenesis and normal fertility. The aim of this study was to investigate the difference between the effects of testosterone and epitestosterone on normal and in chemically castrated Wistar rats. We also tested the effects of these hormones when the iAR-dependent pathways were inhibited by the antiandrogen flutamide. Rats were chemically castrated on postnatal day (pnd) 5 using EDS, a cytotoxic agent that promotes apoptosis of Leydig cells, reducing androgen levels. Then, animals received replacement with testosterone or epitestosterone and were treated or not with flutamide from pnd 6 to pnd 13 or 20 and were euthanized on pnd 14 or 21. Animals treated with epitestosterone and flutamide showed lower body weight. Epididymis weight was also reduced in animals treated with epitestosterone and flutamide. Flutamide *per se* reduced epididymis weight at both ages (pnd 14 and 21). Testicular weight and the testicular/body weight ratio were reduced in EDS group, and flutamide further reduced this weight in animals which received testosterone replacement. EDS administration reduced mRNA levels of both AMH (anti-müllerian hormone) and its receptor, AMHR2, at pnd 14. In the testes of flutamide-treated animals, epitestosterone reduced AMH, and both testosterone and epitestosterone replacement diminished AMHR2 mRNA expression also on pnd 14. EDS decreased iAR expression, and androgen replacement did not change this effect on pnd 21. In rats receiving flutamide, only those also receiving testosterone and epitestosterone replacement exhibited decreased iAR expression. An increase in connexin-43 expression was observed in animals treated with epitestosterone without flutamide, whereas in rats treated with flutamide, both hormones were ineffective in recovery connexin 43-expression reduced by EDS. Our results suggest that epitestosterone has an antiandrogen effect on androgen-sensitive tissues such as the epididymis. Nonetheless, the effects of testosterone and epitestosterone on testicular development parameters although similar, can be mediated by different mechanisms. AMH seems to modulate the balance of the action of testosterone and epitestosterone, which is essential for testicular development and maturation. AMH seems to modulate the balance between the synthesis of testosterone and epitestosterone, which is essential for testicular development and maturation.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Mecanismos de ação dos andrógenos .....	25
Figura 2 – Estudo-piloto .....	46
Figura 3 - Grupos experimentais .....	48
Figura 4 - Protocolo experimental .....	49
Figura 5 - Concentração de testosterona no soro.....	57
Figura 6 – Variação do peso corporal.....	57
Figura 7 – Peso testicular .....	58
Figura 8 – Relação peso testicular/peso corporal .....	58
Figura 9 - Variação do peso corporal .....	59
Figura 10 – Índice anogenital .....	60
Figura 11 – Peso do epidídimo.....	61
Figura 12 - Peso testicular .....	62
Figura 13 – Relação peso testicular/peso corporal .....	63
Figura 14 – Quantificação relativa do RNAm do AMH .....	64
Figura 15 - Quantificação relativa do RNAm do AMHR2 .....	65
Figura 16 - Imunoconteúdo do AMHR2 .....	65
Figura 17 - Quantificação relativa do RNAm do iAR.....	66
Figura 18 - Imunoconteúdo do iAR .....	67
Figura 19 – Imunoconteúdo da ocludina .....	68
Figura 20 - Imunoconteúdo da Cx43 .....	69
Figura 22 – Efeitos androgênicos da testosterona e da epitestosterona.....	85

## LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Enzimas esteroideogênicas.....	21
Quadro 2 – Reagentes e hormônios utilizados no protocolo experimental .....	47
Quadro 3 – Anticorpos primários e secundários.....	53

## LISTA DE ABREVIATURAS

AMH: Hormônio Anti-mülleriano  
AMHR1: receptor do AMH tipo 1  
AMHR2: receptor do AMH tipo 2  
AMPc: adenosina monofosfato cíclico  
ANOVA: teste de análise de variância  
ARE: elementos de resposta aos andrógenos  
ARKO: camundongo *Knockout* para iAR  
ATP: Adenosina Trifosfato  
BHT: barreira hemato-testicular  
cDNA: DNA complementar  
CEUA: Comissão de Ética no Uso de Animais CEUA  
CG: gonadotrofina coriônica  
CONCEA: Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal  
CREAL: Centro de Reprodução e Experimentação de Animais de Laboratório da UFRGS  
CREB: Proteína ligada ao elemento de resposta a AMPc  
Ct: ciclo *threshold*  
Cx43: conexina-43  
D3: enzimas deiodinase tipo 1  
DAG: distância anogenital  
DHEA: desidroepiandrosterona  
DHT: di-hidrotestosterona  
dpc: dia pós-coito  
dpn: dia pós-natal  
EDS: Etano-1,2-dimetilsulfonato  
EpiT: Epitestosterona  
ER: receptor de estrogênio  
ERK: proteínas quinases reguladas por estímulos extracelulares  
FLCARKO: camundongo *knockout* para iAR nas células de Leydig fetais  
FSH: Hormônio Folículo Estimulante  
FSHR: receptor de FSH  
GAPDH: gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase  
GnRH: hormônio liberador de gonadotrofinas GPCR: Receptor acoplado à proteína G  
HCPA: Hospital de Clínicas de Porto Alegre  
HHG: eixo hipotálamo-hipófise-gônadas  
HSD: enzima hidroxisteroide desidrogenase  
IAG: índice anogenital  
iAR: Receptor intracelular de androgênios  
IGF1: Fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1  
INLS3: fator 3 semelhante à insulina  
IP<sub>3</sub>: Inositol-3,4,5-Trifosfato  
K<sup>+</sup>: Íon potássio  
K<sup>+</sup><sub>ATP</sub>: Canais de Potássio Sensíveis a ATP  
LH: Hormônio Luteinizante  
LHR: receptor de LH

MAPK: proteína cinase ativada por mitógeno  
mAR: receptor de androgênios de membrana  
MEK: quinase específica para Ser/Thr  
mg: miligrama  
mL: mililitros  
mM: milimolar  
nm: nanômetro  
P450c17: enzima citocromo P450 17 $\alpha$ -hidroxilase/17,20-liase  
P450scc: enzima de clivagem da cadeia lateral de citocromo P450  
PCR: reação em cadeia da polimerase  
PI3K: fosfatidilinositol 3-quinases  
PIP2: fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato  
PKA : proteína cinase A  
PLC: fosfolipase C  
PVDF: Fluoreto de polivinilideno  
QR: quantificação comparativa  
RAF: quinase específica para Ser/Thr  
RN: Resolução Normativa (RN)  
RNAm: ácido ribonucleico mensageiro  
ROX: corante de referência passiva  
SCARKO: camundongo *Knockout* para iAR nas células de Sertoli  
SDS-PAGE: eletroforese em gel de poli(acrilamida com dodecil sulfato de sódio  
SEM: erro padrão da média  
Src: Proteína tirosina quinase Src  
SRY: região Y determinante do sexo  
T3: 3,5,3'-triiodotironina  
T4: 3,5,3',5'-tetraiodotironina  
TGF- $\beta$ : fator transformador de crescimento beta  
TR $\alpha$ 1: receptor nuclear dos hormônios da tireoide tipo alfa 1)  
TSH: hormônio tireoestimulante  
TTBS: tampão Tris salino  
UEA: Unidade de Experimentação Animal  
VDCC-L: Canais de Ca<sup>+2</sup> dependentes de voltagem do tipo L  
ZIP9 (transportador de zinco).  
 $\alpha$ : Alfa  
 $\beta$ : Beta

## SUMARIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>12</b>
<b>1.1 Estrutura Testicular</b> .....	<b>12</b>
<b>1.2 Regulação Hormonal</b> .....	<b>15</b>
1.2.1 <i>Hormônio Anti-Mülleriano</i> .....	16
1.2.2 <i>Eixo Hipotálamo-Hipófise-Gônadas</i> .....	17
1.2.3 <i>Andrógenos</i> .....	19
1.2.3.1 <i>Testosterona</i> .....	22
1.2.3.2 <i>Epitestosterona</i> .....	22
1.2.3.3 <i>Mecanismos de ação dos hormônios esteroides</i> .....	23
1.2.3.3.1 <i>Ação clássica dos andrógenos</i> .....	27
1.2.3.3.2 <i>Ação não clássica dos andrógenos</i> .....	27
1.2.3.4 <i>Antiandrógenos</i> .....	29
<b>1.3 Desenvolvimento Testicular</b> .....	<b>30</b>
1.3.1 <i>Período fetal</i> .....	32
1.3.2 <i>Período neonatal (1º - 7º dpn)</i> .....	34
1.3.3 <i>Período infantil (8º - 20º dpn)</i> .....	36
1.3.4 <i>Período juvenil (21º ao 32º dpn)</i> .....	38
1.3.5 <i>Período peripuberal (32º ao 55º dpn)</i> .....	39
1.3.6 <i>Período puberal (56º ao 61º dpn)</i> .....	40
<b>2 JUSTIFICATIVA</b> .....	<b>42</b>
<b>3 HIPÓTESE</b> .....	<b>44</b>
<b>4 OBJETIVOS</b> .....	<b>45</b>
4.1 <i>Objetivo geral</i> .....	45
4.2 <i>Objetivos específicos</i> .....	45
<b>5 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>46</b>
5.1 <i>Animais</i> .....	46
5.2 <i>Estudo-piloto</i> .....	46
5.3 <i>Reagentes e hormônios</i> .....	47
5.4 <i>Grupos experimentais</i> .....	47
5.5 <i>Protocolo experimental</i> .....	48
5.6 <i>Eutanásia e coleta dos tecidos</i> .....	49
5.7 <i>Peso corporal e peso de órgãos sensíveis à ação dos andrógenos</i> .....	50
5.8 <i>Distância e índice anogenital</i> .....	50
5.9 <i>qPCR em tempo real</i> .....	51
5.10 <i>Western blot</i> .....	51
5.11 <i>Análise estatística</i> .....	53
5.12 <i>Aspectos éticos</i> .....	54
5.13 <i>Biossegurança e procedimentos de descarte dos materiais biológico, cortante e tóxico</i> .....	55
<b>6 RESULTADOS</b> .....	<b>56</b>
6.1 <i>Efetividade do EDS</i> .....	56

6.1.1 Dosagem de testosterona.....	56
6.1.2 Variação do peso corporal.....	57
6.1.3 Desenvolvimento dos testículos.....	58
6.2 Parâmetros de desenvolvimento .....	59
6.2.1. Variação do peso corporal.....	59
6.2.2 Índice anogenital .....	60
6.2.3 Peso de órgãos sensíveis à ação dos andrógenos.....	60
6.2.4 Desenvolvimento dos testículos.....	61
6.3 Efeito do tratamento hormonal sobre o AMH e o AMHR2 .....	63
6.3.1 Quantificação comparativa do RNAm do AMH .....	63
6.3.2 Quantificação relativa do RNAm e do imunoconteúdo do AMHR2 .....	64
6.4 Quantificação relativa do RNAm e do imunoconteúdo de iAR.....	66
6.5 Imunoconteúdo da ocludina .....	67
6.6 Imunoconteúdo da CX43.....	68
<b>7 DISCUSSÃO .....</b>	<b>70</b>
<b>8 CONCLUSÃO .....</b>	<b>88</b>
<b>PERPECTIVAS .....</b>	<b>89</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>90</b>
<b>ANEXOS.....</b>	<b>109</b>
EDS .....	109

## 1 INTRODUÇÃO

A função básica dos testículos é promover a produção dos espermatozoides (espermatogênese) e de hormônios, esteroides e proteicos, essenciais à função reprodutiva masculina (GOODMAN, 2009). O desenvolvimento testicular, em especial das células de Sertoli, é um fator primordial para a fertilidade do animal adulto (ORTH, 1984).

### 1.1 Estrutura Testicular

Os testículos são órgãos pareados constituídos por duas unidades funcionais: um tecido intersticial e uma rede de túbulos seminíferos (DYM; FAWCETT, 1970) recobertos por células mioides peritubulares e apoiados sobre uma membrana basal subjacente (O'DONNELL; MCLACHLAN, 2012). As células mioides peritubulares mantêm a integridade estrutural dos túbulos seminíferos e secretam fatores parácrinos envolvidos na regulação da morfologia e da função das células de Sertoli (SENGUPTA; ARAFA; ELBARDISI, 2019). O tecido intersticial é formado por células de Leydig, macrófagos, vasos sanguíneos e linfáticos, e os túbulos seminíferos por células de Sertoli e células germinativas (Skinner, 1991; O'Donnell et al., 2006).

No tecido intersticial, dois tipos de células de Leydig têm a função de sintetizar hormônios androgênicos distintos durante as diferentes fases do desenvolvimento: as células de Leydig fetais e as células de Leydig adultas (LORDING; DE KRETZER, 1972). Além da fase do desenvolvimento em que cada tipo celular está presente, estas células diferem também em uma série de características, tais como: origem, morfologia, fisiologia, produção hormonal e regulação (HUHTANIEMI; PELLINIEMI, 1992). As células de Leydig fetais estão presentes desde o período fetal até a maturidade sexual (ARIYARATNE, 2000). A diferenciação das células de Leydig adultas inicia durante a maturação sexual e é dividida em 3 fases: fase progenitora, fase imatura e fase adulta (HARDY; ZIRKIN; EWING, 1989).

Nos túbulos seminíferos de adultos, as células germinativas indiferenciadas dão origem a espermatozoides maduros em um processo cíclico, chamado de espermatogênese, que pode ser dividido em 3 fases: mitose, meiose e espermiogênese (HESS; DE FRANCA, 2008). Os túbulos seminíferos possuem um compartimento basal e um compartimento adluminal (DYM; FAWCETT, 1970). No compartimento basal, localizado junto à membrana basal dos túbulos, as

células de Sertoli e as células germinativas indiferenciadas e em fases iniciais de diferenciação, pré-meiose, mantêm contato com o tecido intersticial já no compartimento adluminal, as células germinativas em estágios mais avançados de diferenciação, meiose e pós-meiose, são mantidas isoladas em um compartimento separado pela barreira hematotesticular (BHT) (GRISWOLD, 1998).

No início da espermatogênese, células germinativas indiferenciadas se dividem originando espermatócitos primários que atravessam a BHT penetrando no compartimento adluminal onde passam por duas divisões meióticas diferenciando-se em espermatócitos secundários e então, em espermatídes (VALLI et al., 2015). Na espermiogênese, ocorre a diferenciação e maturação das espermatídes, em um processo subdividido em 19 estágios, originando os espermatozoides maduros (LEBLOND; CLERMONT, 1952a).

A disposição dos distintos tipos celulares nos túbulos seminíferos não é aleatória. As gerações de células germinativas em desenvolvimento (espermatogônias, espermatócitos e espermatídes) estão organizadas em associações entre estas células e uma célula de Sertoli, constituindo um ciclo espermatogênico (LEBLOND; CLERMONT, 1952b). Os ciclos espermatogênicos são formados por estágios morfológicos (14 estágios no rato) que ocorrem de forma extremamente organizada, sincronizada e cíclica (HESS; DE FRANCA, 2008). Uma geração de células germinativas progride do estágio I ao XIV (completando um ciclo) e, então, inicia novamente o estágio I (ODONNELL et al., 2006). Em ratos, um ciclo tem a duração de 12,9 dias e são necessários 4,5 ciclos para a produção de espermatozoides (WALKER, 2010). Assim, ao longo dos túbulos seminíferos, vários ciclos espermatogênicos em diferentes estágios ocorrem simultaneamente, formando uma onda espermatogênica (ODONNELL et al., 2006), essencial para a contínua produção de espermatozoides (HESS; DE FRANCA, 2008). À medida que se diferenciam, as células germinativas são movidas em direção ao lúmen dos túbulos (DYM; FAWCETT, 1970) e, ao final da espermiogênese, os espermatozoides são liberados pelas células de Sertoli no lúmen dos túbulos seminíferos (ODONNELL et al., 2006). No epidídimo esses espermatozoides passam pelo processo de maturação adquirindo mobilidade e habilidade de fertilização e são armazenados em um ambiente controlado e protegido (SULLIVAN; BELLEANNÉE, 2018).

As células de Sertoli são essenciais para a espermatogênese que envolve uma complexa interação (*crosstalk*) entre as células testiculares, especialmente entre as células de Sertoli e as células germinativas (WU et al., 2020). Com a meiose, o número de cromossomos passa de

diploide para haploide permitindo a futura troca de informação genética paterna e materna (PELLETIER, 2011). No entanto, as espermátides haploides representam um novo tipo celular e são reconhecidas pelo sistema imunológico como um corpo estranho (REBOURCET; O'SHAUGHNESSY; SMITH, 2019), por isso estas células são isoladas pela BHT em um ambiente protegido mas que as tornam totalmente dependentes das células de Sertoli (GRISWOLD, 1998; SHARPE et al., 2003).

As células de Sertoli desempenham diversas funções essenciais às células germinativas em desenvolvimento (pré-meióticas, meióticas e pós-meióticas), incluindo: promoção da proliferação das células germinativas indiferenciadas e inibição do início da meiose na fase imatura, migração dos espermatócitos para o compartimento adluminal; suporte físico e estrutural, formação e manutenção de um ambiente protegido e controlado; secreção de fluidos, proteínas e fatores de crescimento necessários ao desenvolvimento das células da linhagem espermatogênica; controle da liberação das espermátides maduras no lúmen tubular (espermiacção); mediação da ação dos andrógenos, do hormônio folículo-estimulante (FSH) e do hormônio luteinizante (LH) de acordo com a fase de desenvolvimento testicular (HESS; DE FRANCA, 2008; RUSSELL et al., 1993). Durante os diferentes estágios do ciclo espermatogênico, todos os componentes das células de Sertoli são modificados devido à habilidade destas células de se adaptar às necessidades das células germinativas em desenvolvimento (PARVINEN, 1982).

A BHT é formada por complexos juncionais entre células de Sertoli adjacentes que impedem a passagem de agentes nocivos e complexos imunológicos oriundos do tecido intersticial, criando um compartimento especializado (SHARPE et al., 2003). A coexistência de junções de oclusão, especializações ectoplasmáticas, junções comunicantes e desmossomos faz com que a BHT seja uma das barreiras sangue-tecido mais seletivas (CHENG; MRUK, 2012).

As junções de oclusão são compostas por proteínas como moléculas de adesão juncional claudinas e ocludinas (MOK; MRUK; CHENG, 2013). As ocludinas são proteínas integrais de membrana que interagem com outras proteínas se associando ao citoesqueleto e a outra ocludina de uma células adjacente (CYR et al., 1999).

As junções comunicantes são formadas pela associação de dois hemicanais compostos por proteínas transmembrana estruturais (conexinas) e estabelecem uma conexão direta entre o citoplasma de duas células adjacentes (KUMAR; GILULA, 1996). Os conéxons permitem a difusão passiva de metabólitos, íons e pequenas moléculas (<1 kD) modulando processos

celulares como proliferação, diferenciação e apoptose (GOODENOUGH; GOLIGER; PAUL, 1996). A seletividade e demais propriedades das junções comunicantes são definidas pelas conexinas que as constituem (POINTIS et al., 2011). A maioria das células expressa mais de uma conexina e a conexina-43 (Cx43) é a isoforma mais abundante nos testículos e está presente desde o período fetal formando junções entre células de Leydig, no tecido intersticial, e nos túbulos seminíferos, entre células de Sertoli e entre células de Sertoli e células germinativas (BATIAS et al., 2000).

As junções entre células de Sertoli e células germinativas (espermatogônias e espermatócitos) são unidirecionais, das células de Sertoli para as células germinativas e podem ser formadas pela associação da Cx43 com outras conexinas (DECROUY et al., 2004). As junções comunicantes entre células de Sertoli são bidirecionais, constituídas principalmente por Cx43 (DECROUY et al., 2004; GILLERON et al., 2009) e a sua ausência não é compensada por outras isoformas (POINTIS et al., 2011). A expressão do RNAm e o imunoconteúdo da Cx43 nos testículos variam com o tipo celular, a idade e o estágio do ciclo espermatogênico (RISLEY et al., 1992).

A BHT é uma estrutura dinâmica e complexa, pois, além de isolar os ambientes adluminal e intersticial, possui uma estrutura a qual é capaz de se dissociar para permitir a migração dos espermatócitos do compartimento basal para o adluminal, e, então, se reestruturar novamente (CHAKRABORTY et al., 2014). Enquanto junções de oclusão entre células de Sertoli adjacentes formam-se no lado basal, originando uma nova BHT, a expressão da Cx43 reduz e a barreira do lado adluminal se dissocia permitindo a entrada dos espermatócitos no compartimento adluminal (DYM; FAWCETT, 1970; PELLETIER, 2011).

## 1.2 Regulação Hormonal

A espermatogênese é um processo controlado por uma rede de sistemas regulatórios no qual os andrógenos têm papel crítico (revisado por SUTINEN; MALINEN; PALVIMO, 2017) e depende do adequado desenvolvimento das gônadas. Uma vasta gama de hormônios está envolvida na regulação do desenvolvimento testicular, incluindo: as gonadotrofinas, a testosterona, a epitestosterona, o hormônio Anti-Mülleriano (AMH), os hormônios da tireoide

(T4 (3,5,3',5'-tetraiodotironina) e T3 (3,5,3'-triiodotironina)), o estradiol, e fatores de crescimento.

### 1.2.1 Hormônio Anti-Mülleriano

O AMH pertence à família TGF- $\beta$  (fator transformador de crescimento beta) da qual também fazem parte inibinas, ativinas e fatores de crescimento e de diferenciação. Os membros da família TGF- $\beta$  modulam a proliferação celular e a apoptose em importantes processos biológicos incluindo diferenciação sexual, desenvolvimento das gônadas e espermatogênese (MEHTA; JOSHI; SINGH, 2019; XU et al., 2019).

O AMH é uma glicoproteína homodimérica de 140 kDa, formada por dois monômeros de 70 kDa, que necessita ser clivada para se tornar biologicamente ativa no entanto, a enzima responsável pela clivagem proteolítica do AMH ainda não foi identificada (SILVA; GIACOBINI, 2020). As células de Sertoli e as células da granulosa são as fontes primárias do AMH que atua nas gônadas de forma autócrina e parácrina. Nas fêmeas, o AMH está envolvido no desenvolvimento pós-natal e manutenção da função reprodutora (SILVA; GIACOBINI, 2020) e nos machos, promove a regressão dos ductos de Müller durante o desenvolvimento embrionário (AL-ATTAR et al., 1997). Porém, a expressão do AMH e de seus receptores persiste após o nascimento sugerindo sua participação na regulação de outros processos biológicos, como o desenvolvimento das gônadas.

Os dados da literatura indicam que o AMH é produzido exclusivamente pelas células de Sertoli, que sua expressão diminui progressivamente com a maturação e que com o estabelecimento da BHT o AMH secretado pelas células de Sertoli deixa de ser enviado para a circulação sistêmica e passa a ser secretado para o compartimento adluminal (FRÖJDMAN et al., 1999). Porém, estudos recentes apontam que com a maturação a secreção do AMH pelas células de Sertoli e sua concentração sérica diminuem, mas este passa a ser secretado pelos espermatócitos, no compartimento adluminal (OHYAMA et al., 2017; SILVA; GIACOBINI, 2020).

Entre as suas funções pós-natais conhecidas está a modulação do desenvolvimento e função das células de Leydig (SRIRAMAN et al., 2001). No imaturo o AMH inibe a expressão e a atividade, basal e estimulada pelo FSH, da aromatase, e a expressão do LHR reduzindo a síntese de testosterona (JOSSO et al., 1998; ROUILLER-FABRE et al., 1998; SRIRAMAN et al., 2001). O

AMH também regula a expressão e a atividade das enzimas esteroidogênicas determinando os hormônios secretados em cada fase do desenvolvimento: androstenediona pelas células de Leydig fetais, androsterona pelas células de Leydig progenitoras, androstanediol pelas células de Leydig imaturas e a testosterona pelas células de Leydig adultas (GE; HARDY, 1998; LEE, 2000).

A secreção do AMH e do seu receptor não se limita aos testículos sendo identificados em outros tecidos como próstata, pulmões e cérebro. Além de seus efeitos autócrinos e parácrinos a presença do AMH na corrente sanguínea aponta para uma ação hormonal.

Assim como os demais membros da família de receptores TGF- $\beta$ , o AMH sinaliza através de dois tipos de receptores distintos serina/tirosina cinase com um único domínio transmembrana. A ligação a este receptor é sequencial e é caracterizada pela ligação de um ligante ao receptor primário, também chamado de tipo 2 (AMHR2). Esta ligação induz a montagem de um complexo receptor em que o receptor tipo 2 fosforila e ativa o receptor tipo 1, que é um transdutor de sinal. Uma vez ativado, o receptor tipo 1 (AMHR1), interage transitoriamente com as Smads, proteínas citoplasmáticas receptor-específico que, quando fosforiladas, ligam-se a um parceiro comum, Smad4, que o carrega para dentro do núcleo. Isso permite a ligação ao promotor de genes-alvo com o auxílio de co-ativadores (JOSSO; DI CLEMENTE; GOUÉDARD, 2001). Após o nascimento, o AMHR2 é expresso nas células de Sertoli e células de Leydig fetais e adultas, indicando que o AMH apresenta ação autócrina e parácrina (RACINE et al., 1998).

### *1.2.2 Eixo Hipotálamo-Hipófise-Gônadas*

O controle hormonal do desenvolvimento testicular e da espermatogênese é realizado pelo eixo hipotálamo-hipófise-gônadas (HHG). Sob a influência de hormônios esteroides, fatores de crescimento e neurotransmissores excitatórios e inibitórios, o hipotálamo secreta o hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH) que atua na hipófise estimulando a secreção do LH e do FSH (PICUT et al., 2015).

Os neurônios secretores de GnRH possuem a capacidade intrínseca de gerar atividade rítmica de modo que o GnRH é liberado de forma pulsátil no sistema porta hipotálamo-hipofisário (CAROPPO, 2019). A frequência e a amplitude destes pulsos determinam o padrão

de liberação das gonadotrofinas pela hipófise. Uma alta frequência de pulsos favorece a secreção pulsátil de LH, enquanto uma baixa frequência favorece a liberação de FSH que ocorre, predominantemente, de forma tônica (CAROPPO, 2019). A maturação das gônadas está intimamente interligada com a maturação do eixo HHG (EDELSZTEIN; REY, 2019) e a secreção de FSH e de LH é regulada por retroalimentação negativa e positiva (ODUWOLE; PELTOKETO; HUHTANIEMI, 2018).

Acredita-se que a testosterona e a di-hidrotestosterona (DHT) atuem no hipotálamo reduzindo a frequência dos pulsos de GnRH e que os estrógenos atuem diretamente na hipófise reduzindo a frequência de pulsos de GnRH e, conseqüentemente, diminuindo a amplitude dos pulsos de LH (CAROPPO, 2019; ILACQUA; FRANCOMANO; AVERSA, 2016).

O FSH e o LH, assim como a hCG (gonadotrofina coriônica humana) e o hormônio tireoestimulante (TSH), são glicoproteínas formadas por uma subunidade  $\alpha$  comum e uma subunidade  $\beta$  que lhes confere especificidade (SAYERS; HANYALOGLU, 2018). A ligação desses hormônios aos seus receptores resulta na ativação de vias de sinalização intracelulares envolvidas no crescimento, diferenciação e proliferação celular (SZYMAŃSKA et al., 2018).

Os efeitos do FSH nas células de Sertoli são mediados pelo receptor do FSH (FSHR). O FSHR é um receptor do tipo GPCR (receptor acoplado à proteína G) que pode estar associado a diferentes isoformas de proteínas  $G\alpha$ . Desta maneira, a ligação do FSH aos FSHRs com distintas isoformas de proteínas  $G\alpha$  resulta na ativação de diversas vias de sinalização intracelular (JACOBUS; LOSS; WASSERMANN, 2010) que variam conforme o estágio de maturação das gônadas (CRÉPIEUX et al., 2001). No imaturo, a ligação do FSH ao FSHR ativa a via AC/cAMP/PKA resultando na fosforilação de proteínas estruturais, enzimas e fatores de transcrição (MEANS et al., 1980; SIMONI; GROMOLL; NIESCHLAG, 1997). Esta é considerada a via de sinalização clássica do FSH, porém durante o desenvolvimento ocorre uma mudança (*switch*) na sinalização do FSH e a ativação desta via é reduzida gradativamente. Em estudo *in vitro* com células de Sertoli isoladas o estímulo com FSH não foi capaz de estimular a ativação via AC/cAMP/PKA no 19º dpn (CRÉPIEUX et al., 2001).

Durante o desenvolvimento pré e pós-natal, o FSH é o principal modulador das células de Sertoli estimulando a secreção de AMH e de inibina B e sua proliferação, interferindo diretamente no número final de células de Sertoli (revisado por URRUTIA; GRINSPON; REY, 2019)). A secreção de FSH é regulada pelo mecanismo de retroalimentação positivo e negativo

mediado pelas glicoproteínas, ativinas e inibinas, secretadas pelas gônadas (JÉGOU; ROLLAND, 2018).

Nas gônadas, a ligação do LH ao LHR, também um GPCR, na superfície das células de Leydig promove a ativação de enzimas envolvidas na esteroidogênese, resultando na síntese de andrógenos e na *upregulation* do LHR (DUFAU et al., 1984). Nas células de Leydig adultas, este estímulo inicial é seguido por uma *downregulation* do LHR, que pode persistir por até 14 dias (HSUEH; DAFAU; CATT, 1976; HUHTANIEMI et al., 1982), além da redução do RNAm do LHR (PAKARINEN et al., 1990) e da redução da atividade da enzima citocromo P450 $17\alpha$ -hidroxilase/17,20-liase (P450c17) (NOZU et al., 1981). Essa dessensibilização das células de Leydig adultas, mediada por estrógenos, as impede de responder a um novo pulso de LH (WARREN; DUFAU; CATT, 1982).

Esse mecanismo de dessensibilização mediado por gonadotrofinas têm por finalidade proteger as gônadas adultas de uma exposição a níveis elevados de gonadotrofinas e andrógenos, mas estes mecanismos estão ausentes nas células de Leydig fetais (HUHTANIEMI, 1995). Assim, de forma oposta, a regulação das células de Leydig fetais visa garantir a máxima produção de andrógenos, essencial para a diferenciação e o desenvolvimento dos sistemas reprodutor e nervoso (HUHTANIEMI et al., 1982). Esse mecanismo protetor se desenvolve gradualmente ao longo do desenvolvimento do animal.

A secreção do LH é regulada pela testosterona e pela di-hidrotestosterona (DHT) que atuam no hipotálamo reduzindo a frequência dos pulsos de GnRH e pelos estrógenos que atuam diretamente na hipófise diminuindo a amplitude dos pulsos de LH (CAROPPO, 2019; ILACQUA; FRANCOMANO; AVERSA, 2016).

### 1.2.3 Andrógenos

Os andrógenos exercem efeitos androgênicos e anabólicos. Os efeitos androgênicos estão envolvidos no desenvolvimento do fenótipo masculino durante a embriogênese, e também no desenvolvimento e na maturação sexual na puberdade, na manutenção da função reprodutora, na espermatogênese e no comportamento sexual (PATRÃO; SILVA; AVELLAR, 2009). Já os efeitos anabólicos promovem a síntese proteica, o crescimento muscular e ósseo e a eritropoiese (KICMAN, 2008)

A biossíntese dos andrógenos ocorre a partir do colesterol através de diversas rotas enzimáticas que variam com a idade e a espécie, entre outros fatores. O hormônio final predominante depende do estágio de diferenciação das gônadas e é resultante do balanço entre as enzimas envolvidas na síntese e metabolismo dos andrógenos (GE; HARDY, 1998)

Quadro 1 - Enzimas esteroidogênicas

Enzima	Reação catalisada
P450 <sub>scc</sub> (CYP11A)	colesterol → pregnenolona Primeira e limitante etapa da biossíntese dos andrógenos
P450 <sub>c17</sub> (CYP17)	pregnenolona → 17 $\alpha$ -hidroxipregnenolona → desidroepiandrosterona (DHEA) progesterona → 17 $\alpha$ -hidroxiprogesteronona → androstenediona 5 $\alpha$ -pregnane-3 $\alpha$ -ol-20-one → 5 $\alpha$ -pregnane-3 $\alpha$ ,17 $\alpha$ -diol-20-one → androsterona
3 $\beta$ -HSD	pregnenolona → progesterona 17 $\alpha$ -hidroxipregnenolona → 17 $\alpha$ -hidroxiprogesteronona DHEA → androstenediona androstenediol → testosterona epiandrostenediol → epitestosterona
3 $\alpha$ -HSD	5 $\alpha$ -pregnane-3,20-dione → 5 $\alpha$ -pregnane-3 $\alpha$ -ol-20-one androstenediona → androsterona androstenediol → DHT
17 $\beta$ -HSD	androstenediona → testosterona DHEA → androstenediol androsterona → androstenediol
17 $\alpha$ -HSD	androstenediona → Epitestosterona DHEA → epiandrostenediol androsterona → epiandrostenediol
5 $\alpha$ -redutase	testosterona → DHT progesterona → 5 $\alpha$ -pregnane-3,20-dione androstenediona → androstenediona
P450 aromatase	testosterona → estradiol

Referências: (ATANASSOVA; KOEVA, 2012; BELLEMARE et al., 2005; LI; ZIRKIN; PAPADOPOULOS, 2018; PAYNE, 2007; PAYNE; HALES, 2004; VIGER; ROBAIRE, 1995). Fonte: Quadro elaborado pela autora.

### 1.2.3.1 Testosterona

A testosterona ( $17\beta$ -hidroxiandrost-4-en-3-one) é o principal andrógeno produzido nos testículos durante a vida fetal e adulta (GE; HARDY, 1998; O'SHAUGHNESSY et al., 2000). A enzima  $17\beta$ -hidroxiesteróide desidrogenase (HSD) tipo 3 é expressa exclusivamente nos testículos, pelas células de Sertoli imaturas e pelas células de Leydig adultas, e catalisa a etapa final da biossíntese de testosterona convertendo androstenediona em testosterona (PAYNE, 2007). Os efeitos da testosterona podem ser diretos ou indiretos através de sua conversão a DHT, seu metabolito mais potente, ou a estradiol.

### 1.2.3.2 Epitestosterona

A epitestosterona ( $17\alpha$ -hidroxiandrost-4-en-3-one) é um epímero de ocorrência natural da testosterona que foi identificado como um metabolito da testosterona em fatias de fígado de coelhos (CLARK, LELAND C.; KOCHAKIAN, 1947). Por muito tempo acreditou-se que a epitestosterona não exercia nenhuma atividade biológica (DORFMAN; SHIPLEY, 1956), até que diversos trabalhos mostraram que a epitestosterona exerce um efeito antiandrogênico em diferentes tecidos. Este efeito antiandrogênico da epitestosterona se dá por diminuição da síntese de andrógenos e da conversão da testosterona à DHT, através da redução da atividade das enzimas  $17\beta$ -HSD (BICÍKOVÁ; HAMPL; STÁRKA, 1992) e  $5\alpha$ -redutase (MONSALVE; BLAQUIER, 1977; NUCK; LUCKY, 1987). Além disso, a epitestosterona atenua discretamente a liberação de LH e FSH e impede a ação dos andrógenos ligando-se ao receptor intracelular de andrógenos (iAR) (STÁRKA; BICÍKOVÁ; HAMPL, 1989).

A biossíntese da epitestosterona ocorre principalmente a partir da conversão de desidroepiandrosterona (DHEA) em epiandrostenediol e posteriormente a epitestosterona, ou da conversão de DHEA a androstenediona e desta em epitestosterona (BELLEMARE et al., 2005). A enzima  $17\alpha$ -HSD, converte androstenediona em epitestosterona e DHEA em epiandrostenediol (BELLEMARE et al., 2005). Em testículos de ratos e no homem, não há interconversão de epitestosterona a testosterona e vice-versa (STÁRKA; BREUER, 1967). Em crianças, a relação testosterona:epitestosterona no sangue é de 1:1. A concentração de epitestosterona aumenta da infância à puberdade, sendo maior do que a concentração de

testosterona no período pré-púbere. Na puberdade, ocorre um drástico aumento na concentração de testosterona e a relação testosterona:epitestosterona passa a ser de 10:1. A concentração de epitestosterona mantém-se relativamente estável durante a vida adulta, atingindo seu pico em torno dos 35 anos de idade e diminuindo após os 50 anos. Já a concentração de testosterona a partir da puberdade é 5 a 10 vezes maior do que a de epitestosterona. A relação testosterona:epitestosterona é constante durante a vida adulta (Lapcik et al., 1994; Starka et al., 1996; Havlikova et al., 2002).

Quando testosterona, DHT ou androstenediona exógenas são administradas, a taxa de excreção urinária de testosterona aumenta, assim como a relação testosterona:epitestosterona, uma vez que a testosterona não é convertida em epitestosterona e se mantém constante, em humanos. Desta forma, a relação testosterona:epitestosterona é utilizada pelo Comitê Olímpico Internacional (COI) como uma forma de controle anti-doping. Uma relação acima de 6:1 é considerada como suspeita de abuso de esteróides anabolizantes (Lapcik et al., 1994; Starka et al., 1997; Havlikova et al., 2002; Bellemare et al., 2005).

Segundo Starka (2003), a epitestosterona poderia atuar como um hormônio que contribui para a regulação da ação androgênica. Ao menos no período pré-púbere, a epitestosterona parece contribuir para a manutenção da imaturidade sexual (Havlikova et al., 2002).

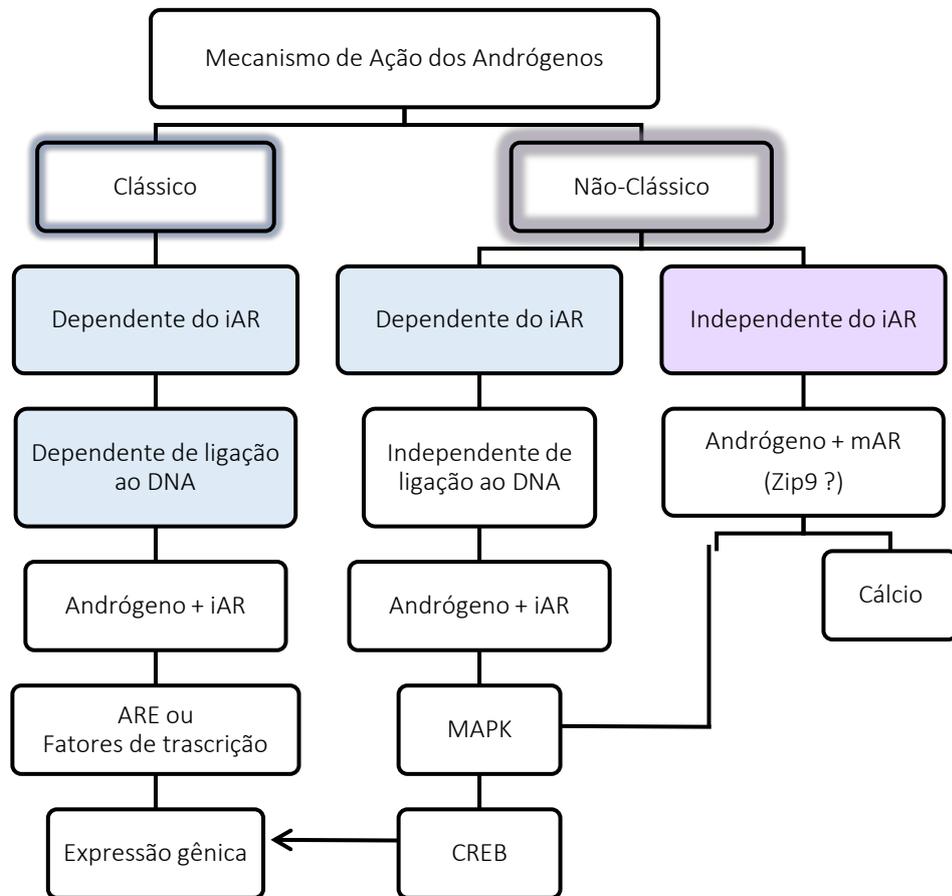
#### *1.2.3.3 Mecanismos de ação dos hormônios esteroides*

Os andrógenos, assim como os demais hormônios esteroides, exercem seus efeitos através do mecanismos de ação clássico (lento) e não clássico (rápido) (BRANN; HENDRY; MAHESH, 1995).

Na via clássica, estes hormônios lipofílicos se difundem através da membrana plasmática ligando-se ao seu receptor intracelular resultando em modulação da transcrição gênica (WILKENFELD; LIN; FRIGO, 2018). São necessários ao menos 30-45 minutos para a modulação da expressão gênica e horas ou até mesmo dias para a síntese de novas proteínas (LÖSEL; WEHLING, 2003). Por meio do mecanismo não clássico os hormônios esteroides ativam cascatas de sinalização intracelular, alterando processos celulares em um intervalo de

segundos a minutos (FORADORI; WEISER; HANDA, 2008). Os efeitos do mecanismo de ação não clássico não apenas complementam os efeitos do mecanismo clássico, ao contrário do que se supor inicialmente (SILVA; LEITE; WASSERMANN, 2002). Pode ocorrer um *crosstalk* entre as duas vias de modo que ambas atuam em conjunto regulando a transcrição gênica (WALKER, 2010).

Os efeitos dos andrógenos podem ser mediados por esses dois mecanismos: clássico, dependente de iAR/dependente de ligação ao DNA, ou não clássico, que pode ser dependente de iAR/independente de ligação ao DNA ou independente do iAR (DAVEY; GROSSMANN, 2016). Os diferentes mecanismos de ação destes hormônios estão representados na Figura 1 e serão detalhados a seguir.



**Figura 1 - Mecanismos de ação dos andrógenos**

Os efeitos dos andrógenos podem ser mediados pelo mecanismo de ação clássico, via iAR, ou pelo mecanismo não clássico, que pode ser dependente ou independente do iAR. No mecanismo clássico as ações dos andrógenos são dependentes do iAR e da ligação ao DNA e resultam em modulação da transcrição gênica. No mecanismo de ação não clássica dependente de iAR mas independente da ligação ao DNA a ligação do andrógeno ao iAR desencadeia a ativação da cascata MAPK e do fator de transcrição CREB. Os efeitos não clássicos independentes de iAR são mediados pela ligação do andrógeno a um receptor de membrana (mAR), ainda não identificado mas que pode ser o ZIP9. A ativação desta via também resulta na ativação da cascata MAPK e/ou no influxo de cálcio. Pode ocorrer um *crossstalk* entre as vias clássica e não clássica culminando ativação do fator de transcrição CREB e em regulação da transcrição genica. ARE (elementos de resposta aos andrógenos) iAR (receptor intracelular de andrógenos); CREB (proteína ligada ao elemento de resposta a AMPc); mAR (receptor de membrana de andrógenos); ZIP9 (transportador de zinco). Referência: (DAVEY; GROSSMANN, 2016). Fonte: Ilustração elaborada pela autora.

O iAR é um fator de transcrição dependente de ligante, com 110 kDa e aproximadamente 918 aminoácidos, membro da superfamília de receptores dos hormônios esteroides (MATSUMOTO et al., 2008; REY et al., 2009; SMITH; WALKER, 2014). A estrutura do iAR é composta por três domínios funcionais: domínio N-terminal regulador da transcrição, domínio de ligação ao DNA e domínio de ligação ao ligante (DAVEY; GROSSMANN, 2016).

Em condições basais o iAR localiza-se, principalmente, no citoplasma mas também está presente no núcleo e na região próxima a membrana celular (BENNETT et al., 2010; DENG et al., 2017b; MCEWAN; SMITH, 2018). Estudos *in vitro* e *in vivo* mostram que a testosterona em concentração fisiológica ou inferior a encontrada nos testículos promove a migração de iAR para a membrana plasmática (mecanismo não clássico) e para o núcleo (mecanismo clássico) (DENG et al., 2017a; ROBERTS; CHAUVIN, 2019).

Os efeitos da testosterona, da DHT e da epitestosterona são mediados pelo iAR no entanto, a interação com o receptor e os efeitos biológicos desencadeados por estes hormônios são distintos (LUETJENS; WEINBAUER, 2018). A afinidade de ligação da epitestosterona ao iAR corresponde a  $\frac{1}{2}$  da afinidade da DHT (STÁRKA; BIČÍKOVÁ; HAMPL, 1989). Em baixas concentrações de testosterona, como nos tecidos periféricos, a DHT é mais potente do que a testosterona pois apresenta maior afinidade de ligação ao iAR e taxa de dissociação mais lenta. Entretanto, esta diferença não é observada em elevadas concentrações de testosterona como na presente nos testículos (GRINO; GRIFFIN; WILSON, 1990). A concentração intratesticular de testosterona em ratos adultos é de 200-800 nM, aproximadamente 10 vezes superior a concentração sérica porém, a saturação do iAR e o efeito biológico máximo são observados com concentração de testosterona igual ou inferior a 1 nM (revisado em WALKER, 2009). Entretanto, a transcrição gênica regulada pela ligação da testosterona ao iAR depende de uma elevada concentração de iAR na célula (LUETJENS; WEINBAUER, 2018).

Devido a sua expressão em diversos tecidos, o iAR exerce uma ampla gama de efeitos biológicos importantes no desenvolvimento e na manutenção dos sistemas reprodutor, muscular, cardiovascular, imunológico, neurológico e hematopoiético podendo também estar envolvido no desenvolvimento de tumores de próstata, bexiga, fígado, rins e pulmões (DAVEY; GROSSMANN, 2016). Os efeitos da testosterona mediados pelo iAR são essenciais para processos críticos da espermatogênese, como: manutenção e restabelecimento da BHT, meiose, adesão entre espermátides e células de Sertoli e liberação dos espermatozoides (DENG et al., 2017b).

#### *1.2.3.3.1 Ação clássica dos andrógenos*

O mecanismo de ação clássico dos andrógenos baseia-se na modulação da transcrição gênica desencadeada pela ligação dos hormônios ao iAR e ligação ao DNA. Em condições basais, o iAR está associado a um complexo proteico formado por proteínas de choque térmico, proteínas do citoesqueleto e outras proteínas chaperonas (BENNETT et al., 2010; MCEWAN; SMITH, 2018). Os andrógenos penetram na célula e interagem com o domínio de ligação do ligante no iAR formando um complexo hormônio-receptor que é translocado para o núcleo onde se dimeriza, interage com elementos de resposta aos andrógenos (ARE) presentes na região regulatória dos genes-alvo, modulando a expressão gênica de forma direta interagindo com proteínas reguladoras da transcrição gênica (BENNETT et al., 2010; VAN DE WIJNGAART et al., 2012). O complexo hormônio-receptor pode regular, de forma indireta, a transcrição de genes que não contem ARE alterando a expressão ou a atividade de fatores de transcrição secundários, a produção de fatores de crescimento e de outros hormônios (LI; AL-AZZAWI, 2009). Desta forma, estes hormônios regulam processos celulares como: proliferação, diferenciação, apoptose, metabolismo e homeostase (BENNETT et al., 2010).

#### *1.2.3.3.2 Ação não clássica dos andrógenos*

Uma série de evidências indicam que os andrógenos atuam por outros mecanismos, distintos da via clássica. Por exemplo, os níveis intratesticulares de andrógenos estão em concentração muito maior do que a necessária para a saturação do iAR e a modulação da expressão gênica através dos AREs, poucos genes são regulados pela testosterona; um número ainda menor de genes é modulado pela testosterona via AREs; e, muitos dos genes modulados pela testosterona são inibidos na presença de iAR (WALKER, 2010). Além disso, a rápida ativação de cascatas de sinalização intracelular desencadeada pelos andrógenos não é alterada em modelos animais que não expressam iAR (THOMAS, 2018).

Estudos mostram que, através do mecanismo de ação não clássico, a testosterona ativa duas vias de sinalização distintas: uma via dependente de iAR que resulta na ativação da cascata MAPK (RAF/MEK/ERK) e uma via independente de iAR que promove o influxo de cálcio para o citoplasma (RAHMAN; CHRISTIAN, 2007).

Pelo mecanismo de ação não clássico dependente do iAR mas independente de ligação ao DNA, a ligação da testosterona ao iAR promove a associação do complexo hormônio-receptor com a proteína Src (proteína tirosina cinase Src) que resulta na ativação sequencial da Scr, do receptor do fator de crescimento epitelial (EGFR), da cascata MAPK (RAF, MEK, ERK), do fator de transcrição CREB (proteína ligada ao elemento de resposta a AMPc (adenosina monofosfato cíclico) e de fatores de transcrição mediados por CREB (CHENG; WATKINS; WALKER, 2007; DENG et al., 2017a; SMITH; WALKER, 2014). A fosforilação de ERK e CREB ocorre dentro de 1 minuto e os sinais celulares gerados são mantidos por pelo menos 12 horas (FIX et al., 2004).

A via não clássica independente do iAR parece atuar via diferentes mecanismos. A testosterona e a epitestosterona promovem o aumento da captação de cálcio no tecido testicular (após 5 minutos de incubação) e a rápida despolarização (menos de 1 minuto) do potencial de membrana de células de Sertoli de ratos no 4º e 5º dia pós-natal (dpn), que ainda não expressam iAR, e no 15º dpn, na presença de flutamida, antagonista do iAR (DA ROSA et al., 2015; DE CASTRO et al., 2012).

Estudos anteriores de nosso laboratório indicam que o influxo de cálcio promovido pela ação não clássica da testosterona e da epitestosterona é resultante da ativação de um receptor putativo de membrana que ativa a fosfolipase C, a qual hidrolisa o fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato (PIP2) em IP3 (inositol-1,4,5-trifosfato) e DAG (1,2-diacylglicerol). A redução dos níveis de PIP2 na membrana promove o fechamento dos canais de potássio sensíveis a adenosina trifosfato ( $K^+_{ATP}$ ), causando aumento na resistência e despolarização do potencial de membrana, com a consequente abertura de canais de cálcio dependentes de voltagem do tipo L (VDCC-L) e subsequente influxo de cálcio (DE CASTRO et al., 2012; LOSS et al., 2004; VON LEDEBUR et al., 2002). O cálcio é um importante segundo mensageiro regulando processos celulares, como proliferação celular, plasticidade neural e apoptose (BERRIDGE; BOOTMAN; LIPP, 1998)

O receptor de membrana envolvido no efeito não clássico dos andrógenos ainda não foi identificado. Os dados disponíveis até o momento apontam para um GPCR do tipo  $G\alpha_q$ , pois esta resposta não clássica dos andrógenos sobre o potencial de membrana das células de Sertoli e o influxo de cálcio nos testículos é bloqueada pela toxina *pertussis* (LOSS et al., 2004). Recentemente, foi descoberto um receptor de membrana para andrógenos: uma proteína com sete segmentos transmembrana, o ZIP9, que pertence à família SLC39A de transportadores de

zinco (NISHIKAWA; MORI; HARA, 2017). Estes transportadores são expressos pelas células de Sertoli, possuem um sítio de ligação para a testosterona na superfície extracelular e regulam a entrada de zinco para o espaço intracelular e para os depósitos intracelulares (BULLDAN et al., 2017; THOMAS et al., 2018). A ligação da testosterona com o ZIP9 e um GPCR, promove o influxo de zinco, a ativação da cascata MAPK e do fator de transcrição CREB (BULLDAN et al., 2016).

#### *1.2.3.4 Antiandrógenos*

Antiandrógenos são substâncias que previnem a ação dos andrógenos (DORFMAN, 1965) sendo classificadas como inibidores de síntese dos andrógenos ou antagonistas do iAR (HEJMEJ; BILINSKA, 2018). Os inibidores de síntese dos andrógenos atuam diminuindo sua síntese/secreção, inibindo a liberação do GnRH e das gonadotrofinas, especialmente LH, e os antagonistas do iAR competem com estes hormônios pelo domínio de ligação do ligante no iAR (DORFMAN, 1970; HEJMEJ; BILINSKA, 2018). Os antiandrógenos classificados como puros simulam uma deficiência de testosterona inibindo o mecanismo de retroalimentação negativa, resultando em aumento da secreção das gonadotrofinas e da síntese de testosterona (BROGDEN; CLISSOLD, 1989). Fármacos antiandrógenos são utilizados como tratamento terapêutico de patologias dependentes de andrógenos tais como puberdade precoce e câncer de próstata, todavia, muitos destes fármacos apresentam outros efeitos hormonais: atividade androgênica, estrogênica, antiestrogênica, progesterônica, antiprogesterônica ou antigonadotrófica (NERI et al., 1972).

A flutamida é um antiandrógeno não esteroide, puro, antagonista do iAR, (ORAFIDIYA; MONAGHAN; MCEWAN, 2018; VIGUIER-MARTINEZ et al., 1983) que se destaca entre os demais por não exibir outros efeitos hormonais (NERI et al., 1972) e por seu efeito antiandrogênico ser específico somente a órgãos dependentes de andrógenos. No fígado a flutamida é metabolizada à 2-hidroxi-flutamida que apresenta afinidade de ligação ao iAR 25 vezes maior sendo o principal mediador de seus efeitos (HEJMEJ; BILINSKA, 2018; SIMARD et al., 1986).

A flutamida e a hidroxi-flutamida ligam-se ao domínio de ligação do ligante no iAR alterando sua conformação e impedindo a ligação dos andrógenos. O efeito inibitório da flutamida sobre a transcrição gênica mediada pelo iAR é resultante da redução da associação

do iAR a correguladores pois a flutamida não impede a translocação do iAR para o núcleo ou sua ligação ao DNA (ILAGAN et al., 2005). Em estudo realizado por Deng e colaboradores (2017) a pré-incubação com flutamida não alterou a localização do iAR em condições basais, mas inibiu a fosforilação de proteínas cinases e a translocação do iAR para o núcleo e para a região próxima a membrana celular em resposta a testosterona.

Inicialmente se acreditava que a flutamida não exercia nenhum efeito agonista no iAR (BROGDEN; CHRISP, 1991) contudo, estudos recentes mostram que a hidroxiflutamida pode ligar-se ao iAR e atuar como um agonista. Desta forma a flutamida modula vias de sinalização dependentes de proteínas cinases, pelo mecanismo de ação clássico, estimulando a expressão da Akt e ERK1/2 e pelo mecanismo não clássico desencadeando a rápida fosforilação da Akt e ERK1/2 (CHOJNACKA et al., 2016).

### 1.3 Desenvolvimento Testicular

O desenvolvimento dos testículos inicia-se durante a diferenciação sexual do feto e estende-se até a maturidade sexual no animal adulto. Ao longo do desenvolvimento, estes órgãos sofrem importantes mudanças morfológicas e funcionais (SHARPE et al., 2003).

A maturação sexual é um processo de múltiplas etapas que ocorre durante a puberdade, envolvendo mudanças moleculares, bioquímicas, morfológicas e funcionais das células de Sertoli. Uma etapa crítica deste processo é a transição (*switch*) da célula de Sertoli de uma fase de proliferação para uma fase de maturação celular. A fase imatura, de proliferação celular, é independente de andrógenos e as funções das células de Sertoli estão relacionadas, principalmente, à regulação do desenvolvimento das gônadas. Na fase de maturação, não proliferativa e dependente de andrógenos, as células de Sertoli assumem funções relacionadas ao suporte da espermatogênese.

A transição (*switch*) entre essas duas fases é controlada principalmente pelo FSH e pelos hormônios da tireoide. O FSH deixa de estimular a proliferação e passa a estimular a maturação celular e a modular a transcrição de genes envolvidos no metabolismo das células germinativas e na regulação da espermatogênese (SANTI et al., 2020). Os hormônios da tireoide regulam o desenvolvimento das células de Sertoli de diversas formas: inibindo a expressão de AMH (CHAMINDRANI MENDIS-HANDAGAMA; SIRIL ARIYARATNE, 2008) e de proteínas envolvidas na

proliferação celular; estimulando a expressão de marcadores de maturação celular; aumentando a sensibilidade das células de Sertoli aos andrógenos (aumentando a expressão de iAR e diminuindo a expressão do receptor de estrogênio (ER) e de aromatase nas células de Sertoli); estimulando a expressão de Cx43 e de outras proteínas envolvidas na formação da BHT; aumentando a expressão de Fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1 (IGF-1) e estimulando a produção de inibina que atua no eixo HHG inibindo a secreção de FSH (revisado por HERNANDEZ, 2018a). Nas células germinativas, o T3 tem efeitos semelhantes aos observados nas células de Sertoli, inibindo a proliferação e estimulando o início da espermatogênese (revisado por HERNANDEZ, 2018a). O T3 estimula a diferenciação e a proliferação das células de Leydig progenitoras e sua diferenciação à células de Leydig imaturas (MENDIS-HANDAGAMA; ARIYARATNE, 2004) e estimula a síntese de testosterona estimulando a maturação sexual (CHAMINDRANI MENDIS-HANDAGAMA; SIRIL ARIYARATNE, 2005) e contrapondo as ações do AMH que inibe a proliferação das células de Leydig progenitoras e a síntese de testosterona promovendo a manutenção da imaturidade sexual.

O resultado final da maturação é a perda da capacidade de proliferação das células de Sertoli, a diminuição da sensibilidade ao estradiol e o aumento da sensibilidade aos andrógenos com o início das divisões meióticas das células germinativas e a formação da BHT. Neste sentido, o FSH e a testosterona atuam em conjunto estimulando a diferenciação das células germinativas e o início da meiose (revisado por SANTI et al., 2020). O FSH atua nos estágios iniciais da espermatogênese (até espermátides redondas) e a testosterona nos estágios posteriores (revisado por ODUWOLE; PELTOKETO; HUHTANIEMI, 2018). A testosterona e o FSH modulam, de forma aditiva e/ou sinérgica, a expressão de genes envolvidos na formação e dinâmica da BHT. Os andrógenos parecem estar envolvidos na função da BHT enquanto o FSH parece regular a organização das junções entre células de Sertoli e entre células de Sertoli e células germinativas (revisado por ODUWOLE; PELTOKETO; HUHTANIEMI, 2018).

Em ratos, o desenvolvimento sexual pode ser dividido nos períodos *fetal*, *neonatal* (corresponde ao período entre o dia do nascimento e o 7º dpn); *infantil* (8º ao 20º dpn), *juvenil* (21º ao 32º dpn), *peripuberal* (33º ao 55-60º dpn) e *puberal* (56º - 70º dpn) (OJEDA; SKINNER, 2006; PICUT et al., 2015).

### 1.3.1 Período fetal

No feto masculino, a diferenciação sexual inicia-se entre o 11<sup>o</sup> e o 12<sup>o</sup> dia pós-coito (dpc), com a diferenciação das células de Sertoli, a partir da expressão do gene SRY (região Y determinante do sexo) (REY, 1999). A expressão de Cx43 inicia antes da diferenciação sexual, nas células precursoras das células de Sertoli, células de Leydig e células germinativas, desempenhando importante papel no desenvolvimento das gônadas (MARTHA PÉREZ-ARMENDARIZ et al., 2001).

Uma vez diferenciadas, as células de Sertoli coordenam o desenvolvimento das gônadas e impedem que as células germinativas entrem em meiose (CUPP; SKINNER, 2005). Finos cordões seminíferos são formados por células germinativas e células de Sertoli, ambas com intensa atividade mitótica (PICUT et al., 2015). As divisões das células germinativas, entretanto, são interrompidas ao final do período fetal (CLERMONT; PEREY, 1957). O período de proliferação máxima das células de Sertoli ocorre entre o 20<sup>o</sup> e o 21<sup>o</sup> dpc (ORTH, 1982).

Após a diferenciação sexual, a Cx43 é expressa entre células de Leydig, entre células de Sertoli e entre células de Sertoli e células germinativas. Tanto nas células de Leydig fetais quanto nas células de Sertoli, a expressão da Cx43 aumenta progressivamente durante o período fetal (MARTHA PÉREZ-ARMENDARIZ et al., 2001).

Após a diferenciação morfológica dos testículos, inicia-se o desenvolvimento do fenótipo masculino. Entre o 14<sup>o</sup> e o 15<sup>o</sup> dpc as células de Sertoli começam a sintetizar o AMH, que é responsável pela regressão dos ductos de Müller (BLANCHARD; JOSSO, 1974). Porém, tanto a expressão quanto a imunorreatividade ao AMH permanecem elevadas até o final do período fetal, após a regressão dos ductos de Müller, que ocorre no 17<sup>o</sup> dpc (HIROBE et al., 1992; KURODA et al., 1990; UENO et al., 1989). Nas células de Sertoli fetais e imaturas, o AMH reduz a atividade e a expressão da aromatase estimulada pelo FSH e nas células de Leydig fetais *in vitro*, o AMH diminui a atividade das enzimas esteroidogênicas (ROUILLER-FABRE et al., 1998). O AMHR2 é encontrado nos ductos de Müller e nos túbulos seminíferos (TEIXEIRA et al., 1996).

A diferenciação das células de Leydig fetais inicia-se no 15<sup>o</sup> dpc sendo regulada pelas células de Sertoli mas sofrendo influência das células peritubulares, células germinativas, vasculares e, de forma autócrina, de biomoléculas produzidas pelas próprias células de Leydig fetais (WEN; CHENG; LIU, 2016). No entanto, a manutenção do número e da função das células

de Leydig fetais não depende das células de Sertoli, nem das células peritubulares e germinativas (REBOURCET et al., 2014). O aumento no número destas células se dá somente a partir da diferenciação, uma vez que as células de Leydig fetais não possuem atividade mitótica (ORTH, 1982). Assim que se diferenciam, as células de Leydig fetais começam a expressar as enzimas esteroideogênicas e a sintetizar INSL3 (fator 3 semelhante à insulina) e androstenediona, que é convertida à testosterona pela enzima  $17\beta$ -HSD3 expressa nas células de Sertoli imaturas (HABERT; PICON, 1984; MAJDIC; SAUNDERS; TEERDS, 1998; SHIMA et al., 2013). Já nas células de Leydig fetais, a expressão da  $17\beta$ -HSD3 durante o período fetal é controversa (GRISWOLD; BEHRINGER, 2009). Assim, a testosterona é o principal andrógeno produzido no período fetal pelas células de Leydig fetais em cooperação com as células de Sertoli (O'SHAUGHNESSY et al., 2000; WELSH; WIEBE, 1978).

O número de células de Leydig fetais, assim como a produção de andrógenos, atingem o pico no 19º dpc (HABERT; PICON, 1984; TAPANAINEN et al., 1984). Discreta imunomarcagem para o iAR é observada em algumas células intersticiais e peritubulares a partir do 17º dpc tornando-se gradativamente mais intensa (MAJDIC; MILLAR; SAUNDERS, 1995). As células de Sertoli, células germinativas e células de Leydig fetais não expressam iAR no período fetal (DREWS; SULAK; OPPITZ, 2001). Portanto, os efeitos da testosterona nestas células podem ocorrer de forma direta mediados pelo mAR e/ou de forma indireta, por intermédio de outras células, possivelmente das células peritubulares, que expressem iAR neste período (SHARPE, 2005).

A testosterona estimula a formação da genitália interna (epidídimo, ducto deferente e vesículas seminais) a partir dos ductos de Wolff (SCHULTZ; WILSON, 1974). Parte desta testosterona é enviada a outros tecidos onde é convertida a DHT, promovendo o desenvolvimento da próstata e da genitália externa, ou a estradiol, que estimula a masculinização do sistema nervoso (SCHULTZ; WILSON, 1974; WILSON; GEORGE; GRIFFIN, 1981; WU; SHAH, 2011). Nos testículos, a androstenediona e a testosterona são convertidos a estradiol pela enzima aromatase (revisado por SHAHA, 2009). A atividade da aromatase é estimulada pelo LH e, principalmente, pelo FSH, *in vitro* (WENIGER; CHOURAQUI; ZEIS, 1993; WENIGER; ZEIS, 1988). Contudo, o efeito estimulante do FSH é reduzido na presença do AMH (ROUILLER-FABRE et al., 1998).

A diferenciação das células de Leydig fetais, o início da esteroideogênese e a proliferação das células de Sertoli são independentes das gonadotrofinas (BAKER; O'SHAUGHNESSY, 2001).

As células de Leydig fetais expressam LHR a partir do 15,5º dpc, mas o LH pode ser detectado no plasma somente após o 16º dpc e a placenta de ratos não produz CG (CARR; CHIN, 1985; EL-GEHANI et al., 1998). A expressão dos LHR nas células de Leydig fetais, e a concentração sérica de LH elevam-se gradualmente (EL-GEHANI et al., 1998; ZHANG et al., 1994).

O FSH é detectado na circulação somente a partir do 19º dpc e sua concentração eleva-se consideravelmente até o 21º dpc (NOGUCHI et al., 1997). A expressão de FSHR inicia-se no 17,5º dpc aumentando significativamente até o final da gestação em decorrência da proliferação das células de Sertoli (WARREN et al., 1984), pois a densidade de FSHR nas células de Sertoli em mitose é constante (BORTOLUSSI et al., 1990). Ao final do período fetal, o eixo HHG está estabelecido e os testículos têm capacidade de responder ao estímulo do LH. Entretanto, o eixo HHG ainda está imaturo e sua função não é necessária nesta fase do desenvolvimento (PREVOT, 2015).

### 1.3.2 Período neonatal (1º - 7º dpn)

O período neonatal é caracterizado por intensa proliferação das células de Sertoli e das células germinativas (RAMOS; DYM, 1979). As células de Sertoli apresentam núcleo oval à alongado, repousam sobre a membrana basal e seu citoplasma apresenta projeções apicais que preenchem o centro dos cordões seminíferos (GRISWOLD; MCLEAN, 2006; PICUT et al., 2015). As células germinativas indiferenciadas localizam-se no centro dos cordões seminíferos (AA et al., 2019; NOVI; SABA, 1968). A partir do 4º dpn estas células migram em direção à membrana basal, realocando-se periféricamente entre as células de Sertoli, onde reiniciam o processo de proliferação gerando outra célula germinativa indiferenciada, renovando sua população (*self-renewal*), e uma espermatogônia (DONOVAN; DEMIGUEL, 2005; GRISWOLD; MCLEAN, 2006; WU et al., 2020). O movimento das células em direção à membrana basal é essencial a sua sobrevivência, visto que as células remanescentes no centro dos cordões seminíferos sofrerão apoptose (BOULOGNE et al., 1999). Esta fase de diferenciação inicial das células germinativas (mitose) parece ser independente de andrógenos e estimulada pelo AMH (C. DESJARDINS, 1978; ZHOU; WATTS; HUTSON, 1993).

Ao nascimento, a expressão de Cx43 entre células de Leydig, entre células de Sertoli e entre células de Sertoli e células germinativas é abundante (BRAVO-MORENO et al., 2001). A

imunorreatividade à Cx43 é mais intensa na porção central dos cordões (KOLASA-WOŁOSIUK et al., 2018). No tecido intersticial, a expressão da Cx43 eleva-se progressivamente com o desenvolvimento das células de Leydig (TAN et al., 1996).

A imunorreatividade e a expressão do AMH, elevados nos primeiros dias de vida, diminuem abruptamente após o 5º dpn (HIROBE et al., 1992; KURODA et al., 1990; UENO et al., 1989). A produção de AMH pelas células de Sertoli é estimulada pelo FSH (LUKAS-CROISIER et al., 2003) e sua ação reduz a atividade e a expressão da aromatase, estimulada pelo FSH, nas células de Sertoli fetais e imaturas e diminui a atividade das enzimas esteroidogênicas nas células de Leydig fetais, *in vitro* (ROUILLER-FABRE et al., 1998). A expressão e o imunoconteúdo de AMHR2, presente nas células de Sertoli, são muito baixos entre o 1º e o 5º dpn (BAARENDS et al., 1995; OHYAMA et al., 2015).

Ao nascimento, ocorre uma redução abrupta na concentração sérica de estradiol, em decorrência da interrupção da circulação materno-fetal, liberando o eixo HHG do seu efeito inibitório (PICUT et al., 2015). Conseqüentemente, ocorre um pico transitório no pulso gerador do GnRH, aumentando a secreção das gonadotrofinas e da testosterona (CLARKSON; HERBISON, 2016).

Após este pico inicial, há uma redução da expressão e da atividade das enzimas 3 $\beta$ -HSD e 17 $\beta$ -HSD, reduzindo a síntese de testosterona (DUPONT et al., 1993; PAYNE et al., 1977; PAZ et al., 1980). Estudos realizados em células de Leydig fetais de ratos no 7º e 8º dpn indicam a presença da enzima 17 $\beta$ -HSD, embora em pequena quantidade (DONG et al., 2007; WEISSER et al., 2011). Entretanto, a produção total de andrógenos se mantém constante e a androstenediona é o principal andrógeno secretado (GE; HARDY, 1998; TAPANAINEN et al., 1984). Nas células de Sertoli, apesar da elevada concentração intratesticular de andrógenos nos períodos fetal e neonatal, a expressão de iAR inicia-se somente entre o 5º e o 7º dpn (BREMNER et al., 1994; DA ROSA et al., 2015; REY et al., 2009).

A secreção do FSH está significativamente elevada ao nascimento e diminui nos primeiros dias de vida (LEE et al., 1975) sendo regulada pelo balanço entre o mecanismo de retroalimentação positivo da ativina A e negativo da inibina B que é produzida pelas células de Sertoli (NOGUCHI et al., 1997). A ativina A é secretada pelas células de Sertoli, pelas células peritubulares e pelas as células de Leydig fetais estimulando diretamente a proliferação das células de Sertoli e indiretamente estimulando a secreção do FSH (ARCHAMBEAULT; YAO, 2010; BARAKAT et al., 2008). A elevada secreção de ativina A diminui progressivamente enquanto a

secreção de inibina B e o conteúdo de FSHR aumentam em consequência da crescente população de células de Sertoli (KETELSLEGERS et al., 1978; NOGUCHI et al., 1997). No período neonatal, o FSH estimula a proliferação das células de Sertoli e a produção de AMH (AL-ATTAR et al., 1997; MEACHEM et al., 2005). Além disso, o FSH atua em cooperação com os hormônios da tireoide estimulando a expressão do iAR nas células de Sertoli, após o 5º dpn (ARAMBEPOLA; BUNICK; COOKE, 1998b; ESCOTT; DA ROSA; LOSS, 2015).

Os componentes do eixo HHG estão presentes mas ainda imaturos, especialmente os neurônios secretores de GnRH e há um predomínio de vias inibitórias (ABREU; KAISER, 2016; BOURGUIGNON et al., 1990). Devido a sua imaturidade, o eixo HHG é mais sensível e a pequena quantidade de testosterona produzida é capaz de ativar o mecanismo de retroalimentação negativo reduzindo a produção de LH (PREVOT, 2015). Assim, a concentração sérica de LH diminui e a expressão do LHR se mantém relativamente constante (LEE et al., 1975; WARREN et al., 1984). Além disso, com a insensibilidade das células de Leydig fetais ao estradiol, a produção de andrógenos não é inibida permanecendo independente do eixo HHG (HUHTANIEMI et al., 1982; PREVOT, 2015). Embora tenham maior capacidade esteroidogênica do que as células de Leydig adultas a densidade de LHR nas células fetais é menor do que a das adultas (BORTOLUSSI et al., 1990).

### *1.3.3 Período infantil (8º - 20º dpn)*

Este é um período crítico no qual ocorrem importantes mudanças morfológicas e funcionais que marcam a transição da fase imatura para uma fase de maturação: o início do período infantil é marcado pela proliferação das células de Sertoli e das células germinativas e pelo início da diferenciação e proliferação das células de Leydig progenitoras (PICUT et al., 2015; SIRIL ARIYARATNE, 2000).

As espermatogônias atingem sua densidade máxima igualando ou ultrapassando o número de células de Sertoli (PICUT et al., 2015; RAMOS; DYM, 1979) e passam por uma série de divisões mitóticas dando origem aos espermatócitos primários (DONOVAN; DEMIGUEL, 2005; GRISWOLD; MCLEAN, 2006; WU et al., 2020).

Progressivamente, as células de Sertoli diminuem sua atividade mitótica, que é finalizada em torno do 15º dpn, e iniciam sua maturação (CLERMONT; PEREY, 1957; ORTH,

1982). As modificações que ocorrem nas células de Sertoli durante a maturação sexual incluem: o aumento do tamanho celular, a alteração no formato celular de oval para alongado, a expansão do citoplasma que se estende da membrana basal ao lúmen dos túbulos envolvendo as células germinativas, alterações do seu núcleo que passa a apresentar um nucléolo tripartido e move-se da região central para a membrana basal, a inibição da produção de biomoléculas relacionadas à proliferação e o início da produção de biomoléculas envolvidas na maturação celular (WEIDER et al., 2011).

Há um aumento progressivo da Cx43 entre o 11º e o 20º dpn e as junções comunicantes localizam-se principalmente na região apical e lateral dos cordões seminíferos (GILULA; FAWCETT; AOKI, 1976; TAN et al., 1996). No 16º dpn, as células de Sertoli iniciam a secreção do fluido intratubular, que fornecerá suporte nutricional aos espermátócitos em desenvolvimento e levará à conversão dos cordões seminíferos para túbulos seminíferos com a criação do lúmen tubular, no 18º dpn (NOVI; SABA, 1968; PICUT et al., 2015).

Com a formação da BHT (entre o 12º e o 18º dpn), os espermátócitos primários são transportados para o compartimento adluminal e iniciam o primeiro ciclo espermatogênico (PICUT et al., 2015). Com a meiose os espermátócitos primários diferenciam-se em espermátócitos secundários e então, em espermátides (VALLI et al., 2015). O início das divisões meióticas marca a transição da espermatogênese da fase independente de andrógenos para a fase dependente de andrógenos (PICUT; ZIEJEWSKI; STANISLAUS, 2018).

O início da diferenciação das células de Leydig progenitoras e da sua atividade esteroidogênica ocorre de forma independente de LH. As primeiras células podem ser observadas no interstício a partir do 10º dpn e a expressão das enzimas esteroidogênicas inicia-se no 11º dpn mas LHR é detectado somente no 12º dpn (SIRIL ARIYARATNE, 2000). A androsterona é o principal andrógeno sintetizado pelas células de Leydig progenitoras entretanto, estas células expressam as enzimas esteroidogênicas em pequena quantidade de modo que sua capacidade de produção de esteroides é mínima (GE; HARDY, 1998).

Os andrógenos necessários a esta fase de desenvolvimento são produzidos pelas células de Leydig fetais (predominantemente androstenediona) em cooperação com as células de Sertoli (GE; HARDY, 1998; WELSH; WIEBE, 1978). Nas células de Sertoli, a atividade basal das enzimas 3β-HSD, 17β-HSD e 5α-redutase é estimulada pelo FSH (WELSH; WIEBE, 1978). A expressão de iAR nas células de Sertoli aumenta progressivamente, especialmente, após o 14º dpn, estimulada pelos hormônios da tireoide, FSH e andrógenos (ARAMBEPOLA; BUNICK;

COOKE, 1998a; BREMNER et al., 1994; VERHOEVEN; CAILLEAU, 1988), sendo que os hormônios da tireoide e o FSH apresentam efeito aditivo sobre a expressão do iAR (ARAMBEPOLA; BUNICK; COOKE, 1998a). No tecido intersticial, enquanto algumas células de Leydig progenitoras não apresentam imunorreatividade ao iAR, outras apresentam intensa marcação (TIMURKAAN; GUR; KARAN, 2012).

A concentração sérica de LH continua diminuindo (LEE et al., 1975) e a expressão de LHR nas células de Leydig progenitoras é pequena em comparação às células de Leydig imaturas e adultas (SHAN, 1992).

Em decorrência da redução na secreção da ativina A e do aumento da secreção de inibina, a concentração de FSH continua diminuindo, chegando a sua concentração mínima no 18º dpn (BUZZARD et al., 2004; LEE et al., 1975). Entretanto, a expressão do FSHR nas células de Sertoli aumenta atingindo sua densidade máxima entre o 10º e o 15º dpn (KETELSLEGERS et al., 1978). Conseqüentemente, o FSH permanece estimulando a secreção de AMH e a proliferação das células de Sertoli, embora ambos diminuam gradualmente (CLERMONT; PEREY, 1957; KURODA et al., 1990). A partir do 16º dpn a expressão de FSHR passa a variar conforme o estágio da espermatogênese (RANNIKKO et al., 1996).

O efeito estimulatório do FSH sobre a secreção do AMH é atenuado pelo efeito inibitório resultante do aumento da expressão de iAR nas células de Sertoli e dos níveis intratesticulares de testosterona, da formação da BHT e do início da meiose reduzindo a secreção do AMH pelas células de Sertoli (AL-ATTAR et al., 1997; KURODA et al., 1990). No entanto, após o 15º dpn os espermatócitos iniciam a secreção de AMH no compartimento adluminal, onde atua de forma autócrina e parácrina, nas espermátides, contribuindo nas modificações morfológicas que ocorrem nestas células durante o desenvolvimento (OHYAMA et al., 2017). A expressão de AMHR2 aumenta significativamente entre o 9º e o 14º dpn (BAARENDS et al., 1995; OHYAMA et al., 2015). A imunorreatividade ao AMHR2 nas células de Sertoli é intensa no 10º dpn e diminui progressivamente enquanto aumenta nos espermatócitos (OHYAMA et al., 2015).

#### *1.3.4 Período juvenil (21º ao 32º dpn)*

No período juvenil, a primeira onda espermatogênica progride e espermatócitos secundários são observados no 26º dpn (PICUT et al., 2015). As células de Sertoli apresentam

características citológicas intermediárias entre o estágio indiferenciado proliferativo e maduro não-proliferativo (RAMOS; DYM, 1979). Ocorre uma progressiva mudança na distribuição da Cx43 (GILULA; FAWCETT; AOKI, 1976; TAN et al., 1996), e sua expressão torna-se dependente do estágio de desenvolvimento das células germinativas (ST-PIERRE et al., 2003; TAN et al., 1996) declinando abruptamente quando a estrutura da BHT é modificada para permitir a passagem dos espermatócitos do compartimento basal para o adluminal (DYM; FAWCETT, 1970).

As células de Leydig fetais e as células de Sertoli continuam sendo a principal fonte de andrógenos neste período (ARIYARATNE, 2000; WELSH; WIEBE, 1978). Nas células de Sertoli, a atividade basal da 17 $\beta$ -HSD e da 3 $\beta$ -HSD diminui não respondendo mais ao FSH (WELSH; WIEBE, 1978), contudo, o imunoconteúdo de iAR aumenta e sua expressão passa a variar de acordo com o estágio do ciclo espermatogênico (SHAN, 1992; TIMURKAAN; GUR; KARAN, 2012). Após o 28º dpn, as células de Leydig progenitoras diferenciam-se em células de Leydig imaturas (DONG et al., 2007) e a pequena quantidade de testosterona produzida inicialmente ativa o mecanismo de retroalimentação negativa, diminuindo a secreção de LH (PICUT et al., 2015). Por outro lado, há um aumento significativo na expressão do iAR e do LHR (KETELESLEGERS et al., 1978; SHAN, 1992), aumentando a sensibilidade destas células ao LH (CHEN; SHAW; PAYNE, 1977). A concentração sérica do FSH e a densidade do FSHR nas células de Sertoli aumentam (BORTOLUSSI et al., 1990; NEGRO-VILAR; OJEDA; MCCANN, 1973) estimulando a expressão de LHR nas células de Leydig. Com a maturação do eixo HHG, há um aumento das vias excitatórias e uma redução das vias inibitórias resultando em um aumento da frequência dos pulsos de GnRH (ABREU; KAISER, 2016; BOURGUIGNON et al., 1990). Assim, o eixo HHG, considerado estruturalmente maduro no 25º dpn, torna-se menos sensível ao mecanismo de retroalimentação negativa induzido pela testosterona (PICUT et al., 2015).

### *1.3.5 Período peripuberal (32º ao 55º dpn)*

Durante o período peripuberal, as espermátides passam por todas as 19 etapas de desenvolvimento completando a espermiogênese (PICUT et al., 2015) e em torno do 45º dpn, o primeiro espermatozoide é liberado no lúmen (CLERMONT; PEREY, 1957).

A expressão do AMH diminui progressivamente até o 35º dpn quando estabiliza e a expressão de AMHR2 permanece constante (KURODA et al., 1990; OHYAMA et al., 2015). Neste período, a imunomarcagem de AMH e AMHR2 é fraca nas células de Sertoli e intensa nos espermatócitos (OHYAMA et al., 2017).

A diferenciação das células de Leydig progenitoras à células de Leydig imaturas lhes confere uma maior capacidade esteroidogênica (GE; HARDY, 2007) no entanto, elas começam a sintetizar quantidades significativas de andrógenos somente a partir do 32º - 35º dpn (ARIYARATNE, 2000; PAYNE et al., 1977). Com a diferenciação em células de Leydig imaturas ocorre um aumento na expressão e no conteúdo de iAR (SHAN, 1992; TIMURKAAN; GUR; KARAN, 2012). Nas células de Sertoli, a densidade de iAR varia conforme o estágio do ciclo espermatogênico (ABD EL-MESEEH et al., 2016; TIMURKAAN; GUR; KARAN, 2012) elevando-se nos estágios VI-VII quando os espermatócitos são movidos para o compartimento adluminal.

Com a diminuição da sensibilidade do mecanismo de retroalimentação negativa da testosterona, a secreção de LH e de testosterona aumentam em paralelo, sendo este um marcador de maturidade do eixo HHG (PICUT et al., 2015). Estimulada pelo FSH, a expressão de LHR aumenta progressivamente (VIHKO et al., 1992). A concentração sérica de FSH diminui e a densidade de FSHR nas células de Sertoli continua aumentando (BORTOLUSSI et al., 1990; KETELSLEGERS et al., 1978).

### *1.3.6 Período puberal (56º ao 61º dpn)*

Nesta fase, as gônadas atingem a maturação sexual apresentando características morfológicas de um animal adulto:, todas as etapas do ciclo espermatogênico e a espermiogênese ocorreram em todos os túbulos seminíferos e espermatozoides maduros são observados no epidídimo (GRISWOLD; MCLEAN, 2006; PICUT; ZIEJEWSKI; STANISLAUS, 2018).

As células de Leydig imaturas atingem o estágio final de maturação (HARDY; ZIRKIN; EWING, 1989) o metabolismo da testosterona é reduzido e este passa a ser o principal andrógeno secretado (GE; HARDY, 1998; SHAN et al., 1993). O tecido intersticial do animal adulto é composto por células de Leydig fetais, progenitoras, imaturas e, predominantemente, por células de Leydig adultas (ARIYARATNE, 2000). A expressão de iAR nas células de Leydig adultas diminui (SHAN, 1992) e nas células de Sertoli atinge sua expressão máxima em torno

do 56º dpn (ABD EL-MESEEH et al., 2016; TIMURKAAN; GUR; KARAN, 2012). Nos túbulos seminíferos a expressão de iAR continua aumentando nos estágios VI-VII.

A concentração sérica de LH e FSH se mantém relativamente constantes (KETELSLEGERS et al., 1978) e a densidade de LHR e FSHR aumenta progressivamente (VIHKO et al., 1992). O eixo HHG, embora considerado maduro no 25º dpn, sofre ainda alguns ajustes mais finos até a maturidade sexual em torno do 56º dpn (PICUT et al., 2015; STOKER et al., 2000).

## 2 JUSTIFICATIVA

O fator masculino é um importante componente da infertilidade e está presente em 6-50% dos casais inférteis (BRUGH; MATSCHKE; LIPSHULTZ, 2003; JUNGWIRTH et al., 2012; TURCHI, 2015). O desenvolvimento testicular é crucial para o estabelecimento de um testículo adulto plenamente funcional e do fenótipo masculino como um todo (ORTH, 1984). Os hormônios gonadais também influenciam expressivamente no desenvolvimento e na fisiologia de outros órgãos, como o encéfalo. O comprometimento do desenvolvimento dos testículos pode provocar não só infertilidade ou subfertilidade, mas também alterações no desenvolvimento do sistema nervoso resultando em problemas como déficits de aprendizagem e memória comprometendo a qualidade de vida do indivíduo.

As células de Sertoli são fundamentais ao desenvolvimento, a maturação e à função testicular. A quantidade de espermatozoides produzidos na vida adulta e a composição celular dos testículos ao longo de toda a vida dependem do número de células de Sertoli (ORTH, 1982; REBOURCET et al., 2017). Tendo em vista que a proliferação das células de Sertoli ocorre somente no período perinatal, é fundamental que a imaturidade sexual seja mantida pelo tempo necessário para que as células de Sertoli possam proliferar e amadurecer para, então, fornecer as células germinativas o suporte à espermatogênese.

Conforme já mencionado, o desenvolvimento testicular é um processo complexo regulado por diversos fatores incluindo uma vasta gama de hormônios, como a testosterona, a epitestosterona, o AMH, o FSH, o LH, os hormônios da tireoide, o estradiol e fatores de crescimento. Os efeitos da epitestosterona como um hormônio endógeno são pouco conhecidos e até o momento, não há estudos sobre a expressão da enzima  $17\alpha$ -HSD em testículos de ratos. Entretanto, acredita-se que sua expressão esteja elevada no período neonatal-infantil uma vez que a principal rota de síntese da epitestosterona ocorre a partir da conversão da androstenediona, principal andrógeno secretado neste período (BELLEMARE et al., 2005). Em diversos tecidos a epitestosterona apresenta ações antagônicas em relação aos efeitos androgênicos da testosterona sendo inclusive, considerada um hormônio antiandrogênico (STÁRKA, 2003). Entretanto, nas gônadas imaturas a testosterona e a epitestosterona parecem atuar de forma muito semelhante promovendo o desenvolvimento testicular. Estes efeitos são mediados por um receptor de andrógenos de membrana (mAR) pois os dois hormônios produzem alteração do potencial de membrana das células de Sertoli e

umentam o influxo de cálcio em testículo de ratos neonatos que ainda não expressam iAR nas células de Sertoli e de ratos pré-puberes com iAR bloqueado pela flutamida (DA ROSA et al., 2015; DE CASTRO et al., 2012). Esses dados sugerem que no período perinatal o efeito dos andrógenos nas células de Sertoli se dá exclusivamente através da via não clássica, independente de iAR (DA ROSA et al., 2015). Com o aumento da expressão do iAR nas células de Sertoli e da sua concentração intratesticular a testosterona promove efeitos adicionais relacionados à maturação sexual (SHARPE et al., 2003; WEN; CHENG; LIU, 2016).

Desta forma, o balanço da ação da testosterona e da epitestosterona parece ser essencial ao desenvolvimento e a maturação das gônadas. Sabe-se que o AMH modula as enzimas esteroidogênicas no entanto, a gama de hormônios e os mecanismos envolvidos na manutenção da imaturidade pelo período necessário para o desenvolvimento, proliferação e a maturação das células de Sertoli ainda não são totalmente conhecidos. Embora os efeitos dos andrógenos mediados pelo mecanismo de ação clássico e não clássico sejam amplamente estudados em modelos *in vitro*, estudos *in vivo*, especialmente durante a fase de desenvolvimento, são escassos.

Ao longo do desenvolvimento testicular, a biossíntese dos andrógenos, a expressão do AMH, do iAR e da Cx43 estão intimamente relacionados. Neste sentido, justifica-se investigar os efeitos clássicos e não clássicos dependentes de iAR e não clássicos independentes de iAR mediados pela testosterona e pela epitestosterona em um modelo *in vivo*, além da expressão e/ou imunoconteúdo do AMH, do AMHR2, da ocludina, da Cx43 e do iAR, como marcadores do processo de maturação.

Considerando que os eventos que ocorrem no período perinatal são fundamentais para garantir a fertilidade no adulto (ORTH, 1984) os dados obtidos no presente trabalho contribuirão com a comunidade científica, aprofundando os conhecimentos dos efeitos hormonais que regulam o desenvolvimento e a maturação testicular essenciais para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas para as desordens da função reprodutora. O rato é um animal conveniente para o estudo do desenvolvimento sexual, pois cresce rapidamente, se reproduz frequentemente, seus sinais externos de maturação sexual são facilmente detectáveis. Além disso, muitos dos resultados obtidos em ratos podem ser extrapolados para outras espécies, incluindo a humana (OJEDA; SKINNER, 2006).

### 3 HIPÓTESE

Durante o desenvolvimento, a testosterona e a epitestosterona atuam nos testículos de forma semelhante promovendo o desenvolvimento testicular, através de um mecanismo independente de iAR. Entretanto, ao se ligar ao seu receptor intracelular, a testosterona desencadeia efeitos clássicos e não clássicos dependentes de iAR estimulando a maturação sexual.

Nossa hipótese é que balanço da ação da testosterona e da epitestosterona seja fundamental para o desenvolvimento e a maturação testicular. No período pós-natal a síntese de epitestosterona predomina e através de sua ação no mAR promove o desenvolvimento testicular e a manutenção da imaturidade sexual enquanto as células de Sertoli se proliferam e com a puberdade este balanço se inverte e a testosterona atua no iAR promovendo a maturação sexual e o início da espermatogênese.

## 4 OBJETIVOS

### 4.1 Objetivo geral

Avaliar o efeito da testosterona e da epitestosterona no desenvolvimento testicular de ratos.

### 4.2 Objetivos específicos

\* Identificar os efeitos clássicos e não clássicos do tratamento *in vivo* com testosterona e epitestosterona sobre:

- \* parâmetros de desenvolvimento em ratos no 14º e 21º dpn;
- \* a expressão do RNAm do AMH, do AMHR2 e do iAR em testículos de ratos no 14º e 21º dpn;
- \* o imunoconteúdo do AMH, do AMHR2 e do iAR em testículos de ratos no 14º e 21º dpn;
- \* o imunoconteúdo de componentes da BHT (occludina e Cx43) em testículos de ratos no 14º e 21º dpn;

## 5 MATERIAIS E MÉTODOS

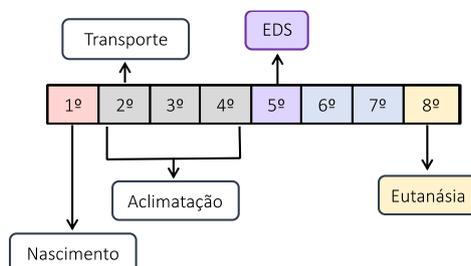
### 5.1 Animais

Foram utilizados 189 filhotes machos e 26 fêmeas adultas de ratos, da espécie *Rattus norvegicus* - linhagem Wistar, provenientes do Centro de Reprodução e Experimentação de Animais de Laboratório (CREAL) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS).

Os animais foram transportados, em veículo climatizado, ao biotério da Unidade de Experimentação Animal (UEA) do Centro de Pesquisa Experimental do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA). Na UEA, os animais foram alojados em caixas-criadouro, acopladas a racks ventiladas. Foi fornecido material autoclavado para a construção do ninho. As mães receberam ração e água *ad libitum*. O biotério da UEA segue as condições-padrão com controle de temperatura em  $22^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$ , e umidade entre 40 - 60 % e ciclo claro/escuro de 12 horas.

### 5.2 Estudo-piloto

Antes do início da execução do protocolo experimental foi realizado um estudo-piloto para avaliar a efetividade do EDS (Etano-1,2-dimetilsulfonato) em realizar a castração química. Para isso, foi realizada a dosagem de testosterona no soro dos animais que receberam a administração de EDS (Figura 2).



**Figura 2 – Estudo-piloto**

As ninhadas foram padronizadas no 1º dpn e transportadas do CREAL à UEA/HCPA no dia seguinte. No 5º dpn, foi realizada a avaliação do peso corporal e a administração de EDS (castração química) ou veículo. No 8º dpn os animais foram eutanasiados e foi coletado o sangue do tronco. As amostras de sangue foram centrifugadas a 4200 rpm por 10 minutos. O soro foi coletado e enviado ao laboratório de análises clínicas do HCPA onde foi realizada a dosagem de testosterona pelo método de eletroquimioluminescência por competição. CREAL (Centro de

Reprodução e Experimentação de Animais de Laboratório); DAG (distância anogenital); EDS (Etano-1,2-dimetilsulfonato); HCPA (Hospital de Clínicas de Porto Alegre); UEA (Unidade de Experimentação Animal); rpm (rotações por minuto). Fonte: Ilustração elaborada pela autora.

### 5.3 Reagentes e hormônios

A administração das substâncias injetáveis aos animais foi realizada por via intraperitoneal (IP) respeitando-se a técnica asséptica.

Os reagentes e hormônios utilizados no protocolo experimental (castração química e tratamento hormonal com ou sem associação com flutamida) estão descritos no Quadro 2.

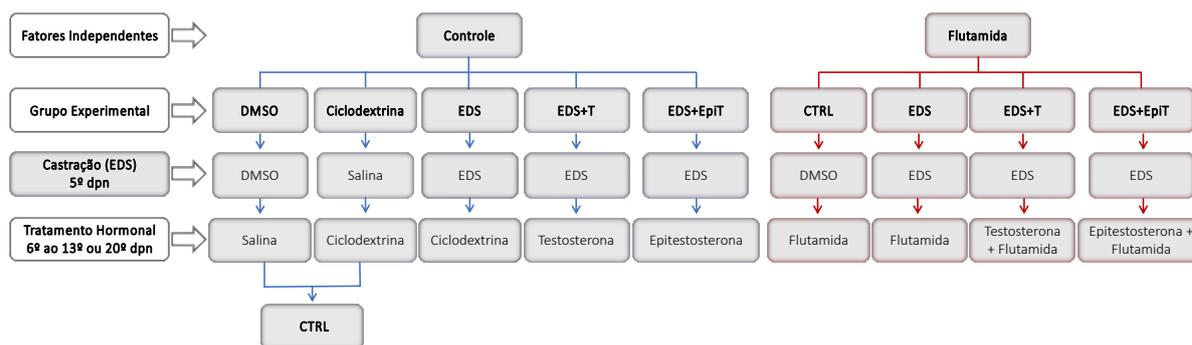
**Quadro 2 – Reagentes e hormônios utilizados no protocolo experimental**

Reagente	Diluyente	Dose	Concentração	Volume	Fabricante
DMSO	-	-		5 mL/kg	<i>Sigma Aldrich</i>
NaCl 0,9%	-	-		5 mL/kg	
Ciclodextrina	Água miliq 22%	-		5 mL/kg	<i>Fluka</i>
EDS	DMSO 25% Água miliq 75%	100 mg/kg	25 mg/mL	5 mL/kg	<i>Epsilon Chimie</i>
Testosterona	Ciclodextrina	2,5 mg/kg/dia	6,5 mg/mL	5 mL/kg	<i>Sigma Aldrich</i>
Epitestosterona	Ciclodextrina	2,5 mg/kg/dia	6,5 mg/mL	5 mL/kg	<i>MyBioSource I</i>
Flutamida	Ciclodextrina	50 mg/kg/dia	12,5 mg/mL	5 mL/kg	<i>MyBioSource I</i>

DMSO (Dimetilsulfóxido-d6); EDS (Etano-1,2-dimetilsulfonato). Fonte: Quadro elaborado pela autora

### 5.4 Grupos experimentais

Com o intuito de identificar os efeitos clássicos e não clássicos da testosterona e da epitestosterona no desenvolvimento das gônadas, os animais foram divididos em dois grandes grupos: controle e flutamida (considerados como fatores independentes na análise estatística). Dentro de cada grande grupo os animais foram subdivididos nos grupos experimentais detalhados na Figura 3.



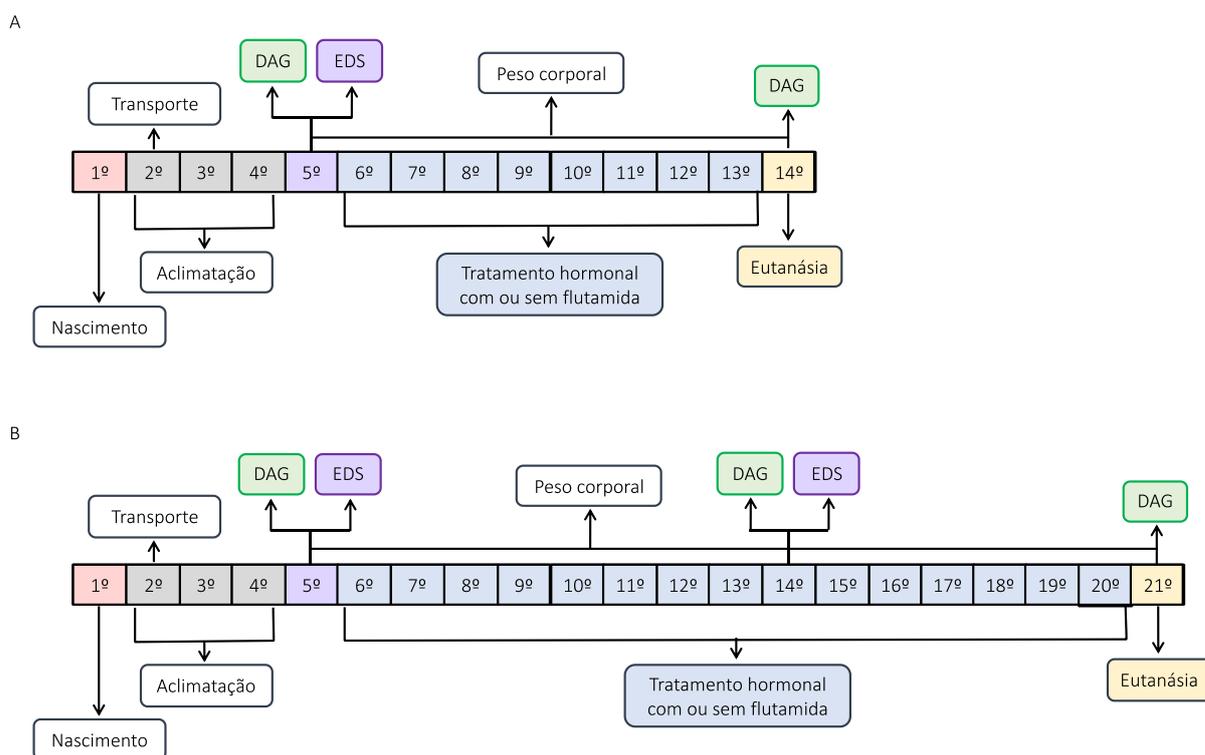
**Figura 3 - Grupos experimentais**

Os animais foram distribuídos em dois grandes conjuntos que representam os fatores independentes controle e flutamida e então alocados nos grupos experimentais. Controle-DMSO: recebeu DMSO no 5º dpn e salina do 6º ao 14º ou 21º dpn; Controle-ciclodextrina: recebeu salina no 5º dpn e ciclodextrina do 6º ao 14º ou 21º dpn; Controle-EDS: recebeu EDS no 5º dpn e ciclodextrina do 6º ao 14º ou 21º dpn; Controle-EDS+T: recebeu EDS no 5º dpn e testosterona do 6º ao 14º ou 21º dpn; Controle-EDS+EpiT: recebeu EDS no 5º dpn e epitestosterona do 6º ao 14º ou 21º dpn; Flutamida-CTRL: recebeu DMSO no 5º dpn e flutamida do 6º ao 14º ou 21º dpn; Flutamida-EDS: recebeu EDS no 5º dpn e flutamida do 6º ao 14º ou 21º dpn; Flutamida-EDS+T: recebeu EDS no 5º dpn e testosterona+flutamida do 6º ao 14º ou 21º dpn; Flutamida-EDS+EpiT: recebeu EDS no 5º dpn e epitestosterona+flutamida do 6º ao 14º ou 21º dpn. Os animais dos grupos Controle-DMSO e Controle-ciclodextrina foram agrupados no grupo Controle-CTRL. CTRL (controle); EDS (Etano-1,2-dimetilsulfonato); dpn (dia pós-natal); T (testosterona); EpiT (epitestosterona).

Para a análise dos dados, os grupos DMSO (veículo do EDS), e ciclodextrina (veículo dos hormônios e da flutamida), foram unificados em um grupo único denominado CTRL ([Figura 3]) ver item 5.11 Análise estatística).

## 5.5 Protocolo experimental

As ninhadas foram padronizadas com 8 filhotes machos e cada filhote foi aleatoriamente alocado a um grupo experimental distinto, evitando assim, o efeito ninhada (irmãos e irmãs de uma mesma ninhada podem apresentar e compartilhar modificações da estrutura de uma proteína, por exemplo). Ao longo de todo o tratamento duas ninhadas (uma do protocolo experimental até o 14º dia e outra do protocolo experimental até o 21º) iniciaram o protocolo experimental no dia. No 14º dpn uma das ninhadas era eutanasiada e a outra seguia até o 21º dpn. Um esquema detalhado do protocolo experimental pode ser observado na Figura 4.



**Figura 4 - Protocolo experimental**

Esquema detalhado do protocolo experimental dos animais tratados até o 14<sup>o</sup> (A) e até o 21<sup>o</sup> dpn (B). As ninhadas foram padronizadas no 1<sup>o</sup> dpn e transportadas do CREAL a UEA/HCPA no dia seguinte. No 5<sup>o</sup> dpn, após a aclimação, foi realizada a distribuição dos animais nos grupos experimentais, a avaliação do peso corporal, a mensuração da DAG e a administração do EDS (castração) ou veículo. No 6<sup>o</sup> dpn, os filhotes iniciaram o tratamento hormonal de acordo com os diferentes grupos experimentais (Figura 3). Diariamente (do 6<sup>o</sup> ao 13<sup>o</sup> ou do 6<sup>o</sup> ao 20<sup>o</sup> dpn), cada animal era pesado e recebia o tratamento com administração por via intraperitoneal das seguintes soluções: veículo (salina ou ciclodextrina); testosterona (2,5 mg/kg/dia) ou epitestosterona (2,5 mg/kg/dia); com ou sem associação com flutamida (50 mg/kg/dia); ou somente flutamida (50 mg/kg/dia). No último dia do protocolo experimental (14<sup>o</sup> ou 21<sup>o</sup> dpn) os animais foram retirados da mãe e eutanasiados logo após a avaliação do peso corporal e da DAG. Os animais eutanasiados no 21<sup>o</sup> dpn tiveram a DAG mensurada e receberam uma segunda dose de EDS no 14<sup>o</sup> dpn. CREAL (Centro de Reprodução e Experimentação de Animais de Laboratório), DAG (distância anogenital); EDS (Etano-1,2-dimetilsulfonato), HCPA (Hospital de Clínicas de Porto Alegre); UEA (Unidade de Experimentação Animal).

## 5.6 Eutanásia e coleta dos tecidos

Ao término do protocolo experimental os animais foram eutanasiados por decapitação (ver item 5.12 para detalhes). Além dos testículos, foram coletados outros órgãos que também sofrem ação dos andrógenos: epidídimo, próstata, rins, fígado, baço, coração e estruturas cerebrais (hipotálamo, hipocampo e córtex cerebral). Os testículos e encéfalos foram retirados, rapidamente dissecados, congelados em nitrogênio líquido, e armazenados a -80<sup>o</sup> C. Os

testículos ficaram a -80 °C até o seu processamento e os encéfalos permanecem armazenados para estudos posteriores.

A eutanásia das mães foi efetuada por sobredose anestésica de isoflurano por via inalatória em câmara de eutanásia. Os sinais clínicos condizentes com óbito (ausência de movimento respiratório, ausência de batimentos cardíacos, ausência de pulsação, mucosas pálidas e perda do reflexo corneal) foram monitorados por um período adicional de 10 minutos após a parada respiratória, conforme RN Nº 13 (BRASIL, 2013a).

### 5.7 Peso corporal e peso de órgãos sensíveis à ação dos andrógenos

Diariamente, entre o 5º e o 13º ou entre o 5º e o 20º dpn, os animais foram pesados e o seu peso corporal foi usado como referência para a administração das substâncias injetáveis. No 14º ou 21º dpn, após a mensuração do peso corporal e eutanásia, os testículos, o epidídimo, a próstata, os rins, o fígado, o baço e o coração foram coletados, dissecados e pesados (peso úmido).

### 5.8 Distância e índice anogenital

A DAG é a distância, em milímetros (mm), entre a genitália externa e o ânus e é empregada como um marcador da ação dos andrógenos (SWAN; KRISTENSEN, 2018). A DAG aumenta com a idade e o crescimento corporal de forma que a maioria dos estudos em roedores utiliza o índice anogenital (IAG) que é calculado dividindo-se a DAG (mm) pela raiz cúbica do peso corporal (g) (GALLAVAN et al., 1999). A DAG foi aferida com o auxílio de um paquímetro digital (*Faithfull Tools*, Kent, UK) no 5º e no 14º dpn ou no 5º, 14º e 21º dpn (Figura 4).

## 5.9 qPCR em tempo real

A técnica de PCR (reação em cadeia da polimerase) em tempo real foi executada no Centro de Pesquisa Experimental do HCPA para avaliar a quantificação relativa do RNAm do AMH, AMHR2 e iAR. Para minimizar as variações interensaio, as amostras de todos os grupos experimentais das duas idades analisadas foram processadas sempre em paralelo.

O RNA total foi extraído com o uso do reagente *TRIzol™ (Invitrogen™)* e posteriormente quantificado, por absorbância a 260 nanômetros (nm), no espectrofotômetro *Nanodrop 1000™ (Thermo Scientific)*. O grau de pureza das amostras foi estimado pela razão da absorbância a 260/280 nm. Após a extração, o RNA total foi submetido à conversão a cDNA (DNA complementar) com a utilização da enzima *SuperScript™ III Reverse Transcriptase (Invitrogen™)*. A análise da expressão gênica do AMH, do AMHR2 e do iAR, além do gene de referência, gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase (GAPDH), foi realizada com o uso de sondas *TaqMan® (Applied Biosystems™)*. As reações foram pré-incubadas a 50 °C por 2 minutos e a 95 °C por 10 minutos, e amplificadas, 40 ciclos a 95 °C por 15 segundos e 60-°C por 1 minuto, no equipamento *StepOne™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems™)*. Todas as reações foram submetidas às mesmas condições de análise e normalizadas pelo sinal do corante de referência passiva (ROX). A quantificação da expressão gênica foi calculada pelo método comparativo  $\Delta\Delta Ct$  (ciclo *threshold*) no qual a quantidade de gene-alvo expressa é normalizada pelo gene de referência e por uma amostra calibradora, onde:

$$\Delta Ct_{amostra} = Ct_{GAPDH} - Ct_{amostra}$$

$$\Delta Ct_{amostra\ calibradora} = Ct_{GAPDH} - Ct_{amostra\ calibradora}$$

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{amostra} - \Delta Ct_{amostra\ calibradora}$$

O valor de Ct se refere ao número de ciclos de PCR necessários para que o sinal fluorescente atinja o limiar de detecção. A quantificação comparativa (RQ) foi calculada pela fórmula:  $\log 2^{-\Delta\Delta Ct}$ .

## 5.10 Western blot

A técnica de *Western blot* foi executada no Centro de Pesquisa Experimental do HCPA e utilizada para quantificar o imunoconteúdo das proteínas AMHR2, iAR, Cx43 e ocludina. As

amostras de todos os grupos experimentais nas duas idades analisadas foram processadas sempre em paralelo para minimizar as variações interensaio.

As amostras foram homogeneizadas com tampão de lise, pH 7,4, contendo Tris 20 mM, NaCl 150 mM, EDTA 5 mM, detergentes (glicerol 10% e Tween), inibidores de protease *SIGMAFAST™* (Sigma Aldrich Co) e de fosfatase (NaF 5 mM). O homogeneizado foi centrifugado a 12.000 *xg* por 10 minutos e o sobrenadante foi coletado.

As proteínas foram quantificadas pelo método de Bradford (1976) em espectrofotômetro a 595 nm e os resultados foram expressos em  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ . As amostras contendo 30  $\mu\text{g}$  de proteínas em tampão de amostra (Tris 65 mM, SDS 2%, glicerol 10%, azul de bromofenol 0,002%, pH 6,8) foram aquecidas a 90 °C por 3 minutos para desnaturar as proteínas.

As proteínas foram então separadas por SDS-PAGE (eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio) com gel de empacotamento de 4% e gel de separação de 8 a 12%, de acordo com o peso molecular da proteína de interesse. A eletroforese foi efetuada no sistema *Mini-protean®* (Bio-Rad Laboratories, Inc.), a 4 °C, a 50 voltz por 30 minutos (até atingir o gel de separação) e 120 volts por 2 a 3 horas (até a frente de corrida atingir o final do gel) na presença de tampão de corrida (Tris 25 mM, SDS 0,1% e glicina 192 mM, pH 8,3). A separação das proteínas foi monitorada pelo azul de bromofenol, presente no tampão de amostra e pelo marcador de peso molecular *Precision Plus Protein Kaleidoscope®* (Bio-Rad Laboratories, Inc.).

Após a eletroforese, as proteínas foram transferidas para membranas de PVDF (polivinilideno difluoreto) em um sistema de eletrotransferência semi-úmido *Trans-Blot® SD Semi-Dry Transfer Cell®* (Bio-Rad Laboratories, Inc). A transferência foi realizada a 20 amperes, por 40 minutos, em tampão contendo Tris 48 mM, glicina 39 mM e metanol 20%, pH 9 a 9,3.

A seguir, as membranas foram incubadas em tampão de bloqueio (leite em pó desnatado 5%, em tampão Tris salino (TTBS) contendo Tris 20 mM, NaCl 140 mM, Tween 20 0,1%, pH 7,6) por 60 minutos, sob agitação, a fim de bloquear ligações a proteínas inespecíficas.

As membranas foram processadas para imunodeteção com os anticorpos primários (diluídos em TTBS), contra as proteínas de interesse (Quadro 3), à 4°C, sob agitação, por 12 a 18 horas e com o anticorpo secundário conjugado com peroxidase por 2 horas, em temperatura ambiente. Antes da incubação com o anticorpo secundário e da revelação as membranas foram lavadas em TTBS por 3 períodos de 10 minutos, sob agitação.

As membranas foram reveladas em sistema de quimiluminescência com *Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrat* (Merck KGaA) no *ImageQuant™ LAS 500* (GE Healthcare Bio-Sciences AB). As imagens obtidas foram analisadas densitometricamente com o software *Image Studio™ Lite* (LI-COR, Inc.). Os resultados de cada membrana foram normalizados pela expressão da GAPDH e expressos em relação ao grupo Controle-CTRL da mesma membrana. O nível de proteína do grupo CTRL foi arbitrariamente definido com 1.

**Quadro 3 – Anticorpos primários e secundários**

Anticorpo	Tempo de incubação	Diluição	Código	Fabricante
Anti-AMRH2	12 a 18 horas	1:500	PA5-76011	Thermo Fisher Scientific Inc.
Anti-AR	12 a 18 horas	1:250	Sc-816	Santa Cruz Biotechnology Inc.
Anti-conexina 43	12 a 18 horas	1:250	71-0700	Thermo Fisher Scientific Inc.
Anti-occludina	12 a 18 horas	1:125	711500	Thermo Fisher Scientific Inc.
Anti-GAPDH	60 minutos	1:20.000	MA-515738	Thermo Fisher Scientific Inc.
Goat anti-rabbit IgG-	90 minutos	1:10.000	AP132P	EMD Millipore Corp.
Goat anti-mouse IgG-	90 minutos	1:10.000	AP124P	EMD Millipore Corp.

AMHR2 (receptor tipo 2 do hormônio anti-mülleriano); AR (receptor intracelular de andrógenos); GAPDH (gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase); IgG (imunoglobulina G).

### 5.11 Análise estatística

Inicialmente os dados foram testados quanto à normalidade (teste de Kolmogorov-Smirnov) e homocedasticidade (teste de Levene) Uma vez que os dados apresentaram distribuição normal e não houve diferença significativa entre as variâncias dos grupos deu-se prosseguimento à análise estatística com testes paramétrico.

O teste t de Student para amostras não-pareadas foi executado entre os grupos DMSO (veículo do EDS) e ciclodextrina (veículo dos hormônios e da flutamida) para todas as variáveis analisadas. Como não foi verificada diferença significativa entre estes dois grupos para nenhuma das variáveis avaliadas, os dados destes grupos foram reunidos em um grupo único,

denominado CTRL. O mesmo teste foi empregado entre os grupos CTRL e EDS a fim de avaliar a efetividade da castração química.

Os demais dados foram analisados pelo teste de análise de variância (ANOVA) de duas vias, seguido do pós-teste de Bonferroni. Tratamento hormonal e flutamida foram empregados na análise como fatores independentes. Os dados foram expressos como média±erro padrão da média (SEM). As diferenças foram consideradas significativas quando  $p < 0,05$ . Todos os testes foram executados no software PASW *Statistics* v.18.8.

### 5.12 Aspectos éticos

O presente trabalho foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do HCPA, sob o nº 16-0133. O grau de invasividade do protocolo experimental foi considerado como grau 2, de acordo com as normas do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA).

Todos os procedimentos foram realizados segundo a Resolução Normativa (RN) nº 13, de 20 de setembro de 2013 (BRASIL, 2013a) e a Resolução Normativa nº 30, de 2 de fevereiro de 2016 (BRASIL, 2016) do CONCEA e de acordo com o estabelecido na Lei 11.794 de 08 de outubro de 2008 (BRASIL, 2008), que estabelece os procedimentos para o uso científico de animais, além dos princípios internacionais para a prática envolvendo animais constantes do *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* (NATIONAL RESEARCH COUNCIL, 2011).

De acordo com o COBEA (Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório) a eutanásia constitui-se na forma humanitária de matar o animal, sem dor e com mínimo desconforto. O método de eutanásia deve assegurar a perda da consciência de forma rápida, irreversível e desprovida de experiência emocional ou física desagradável, ou seja, o animal não deve apresentar dor, estresse, apreensão ou ansiedade (BRASIL, 2013b). Entretanto, o método de eutanásia não pode interferir nos resultados do estudo. A administração de anestésicos acarreta ao animal alterações na secreção de vários hormônios como testosterona, LH, FSH e insulina entre outros (FREE; JAFFE; CHENG, 1980; GOULD, 2008; SAHA et al., 2005). Assim, as alterações na secreção hormonal poderiam interferir nos resultados do trabalho que teve por objetivo justamente avaliar a ação hormonal.

A decapitação de roedores é aceita pelo CONCEA como método de eutanásia em situações em que o uso de anestésicos interferirá no resultado da pesquisa (item 8.2.4 “Decapitação” da RN Nº 13). No item 8.2 “Métodos físicos” da RN Nº 13 o CONCEA salienta que: em alguns casos os métodos físicos podem causar menos estresse ao animal e serem mais rápidos e práticos em relação a outros métodos; além de ser uma manobra rápida, a técnica de decapitação tem como vantagens não contaminar o material biológico a ser utilizado. Portanto, considerando a necessidade de escolha de um método de eutanásia humanitário, a idade/tamanho dos animais (filhotes) e a interferência dos anestésicos nos resultados obtidos, a decapitação foi o método de eutanásia que apresentou mais vantagens sobre desvantagens.

Salientamos que ao longo de todo o processo foram tomados cuidados no sentido de minimizar ao máximo o sofrimento, o medo, a ansiedade e a apreensão dos animais; a eutanásia foi realizada por pesquisador capacitado, longe de outros animais, em local com baixa luminosidade e limpo; a carcaça do animal foi retirada do ambiente e o local, bem como os objetos utilizados foram limpos antes da entrada do próximo animal, conforme item 2 da RN Nº 13, “Critérios a serem adotados para eutanásia” (BRASIL, 2013a).

### **5.13 Biossegurança e procedimentos de descarte dos materiais biológico, cortante e tóxico**

Durante a execução dos experimentos propostos, os pesquisadores envolvidos utilizaram luvas de procedimentos e aventais para a sua própria proteção. Quando necessário foram utilizadas máscaras cirúrgicas e óculos de proteção. Os resíduos biológicos foram descartados em sacos plásticos de coloração branca, próprios para a coleta de material biológico contaminado. Os resíduos químicos sólidos (luvas, ponteiros e tubos impregnados com resíduos químicos) foram acondicionados em sacos plásticos brancos. Os resíduos químicos líquidos foram acondicionados em galões plásticos, identificados, e foram descartados em sacos laranja. Todos os resíduos seguiram a rotina de descarte do lixo hospitalar do HCPA. As seringas e agulhas foram armazenadas em caixas específicas, adequadas para material cortante, identificadas e pertencentes à UEA/HCPA, para posterior recolhimento pela empresa especializada em destinação final de resíduos biológicos.

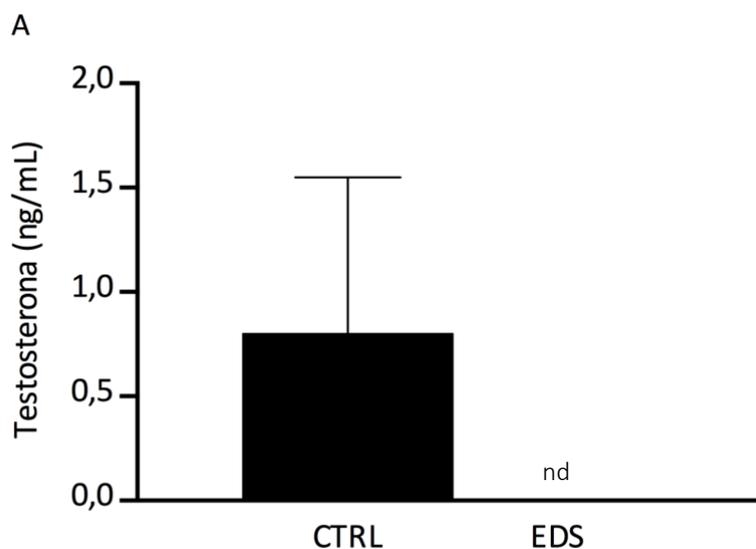
## 6 RESULTADOS

### 6.1. Efetividade do EDS

Com o intuito de validar a eficácia do EDS em efetuar a castração química foi realizado um estudo-piloto no qual foi dosado o nível de testosterona no soro de animais controle e tratados com EDS. Além disso, alguns parâmetros de desenvolvimento, como crescimento corporal, peso dos testículos e a relação peso testicular/peso corporal dos grupos CTRL e EDS foram analisados.

#### *6.1.1 Dosagem de testosterona*

Os animais receberam a administração de EDS (100 mg/kg de peso corporal) ou veículo no 5º dpn e foram eutanasiados no 8º dpn. Nos animais que receberam apenas o veículo (n = 2) a concentração de testosterona no soro foi de 1,33 ng/mL e 0,27 ng/mL. Nos filhotes que receberam EDS (n = 4) a concentração de testosterona foi inferior a 0,025 ng/mL, menor valor detectável pelo ensaio (Figura 5).

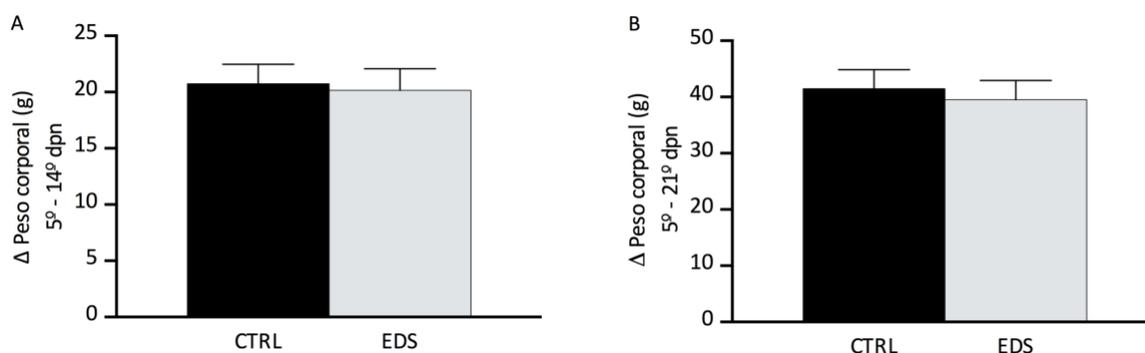


**Figura 5 - Concentração de testosterona no soro**

Concentração de testosterona no soro 3 dias após a administração do EDS; n por grupo: CTRL (2) e EDS (4). Dados apresentados como média  $\pm$  SEM. CTRL (controle); EDS (Etano-1,2-dimetilsulfonato); dpn (dia pós-natal); nd (não detectável).

### 6.1.2 Variação do peso corporal

Não houve diferença significativa no ganho de peso corporal dos animais (Figura 6).

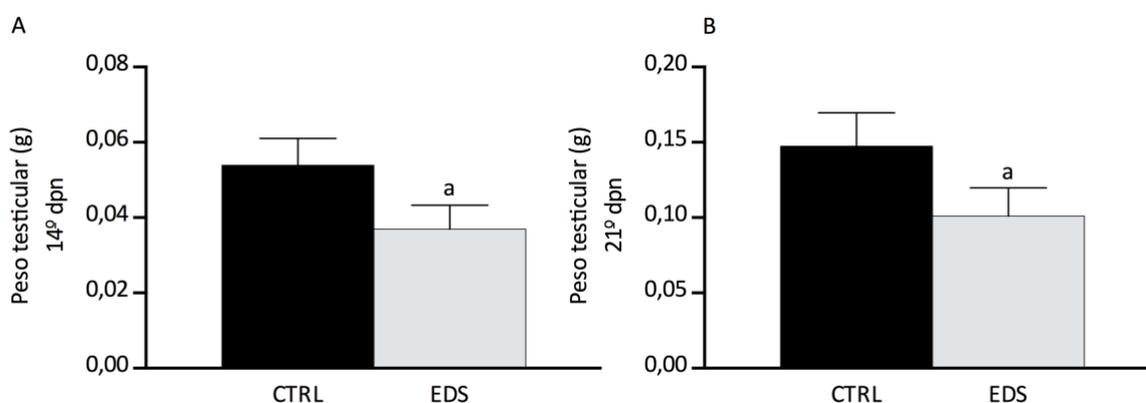


**Figura 6 – Variação do peso corporal**

(A) Variação do peso corporal entre o 5º e o 14º dpn; n por grupo: CTRL (32) e EDS (18). (B) Variação do peso corporal entre o 5º e o 21º dpn; n por grupo: CTRL (17) e EDS (9). Dados apresentados como média  $\pm$  SEM. CTRL (controle); EDS (Etano-1,2-dimetilsulfonato); dpn (dia pós-natal).

### 6.1.3 Desenvolvimento dos testículos

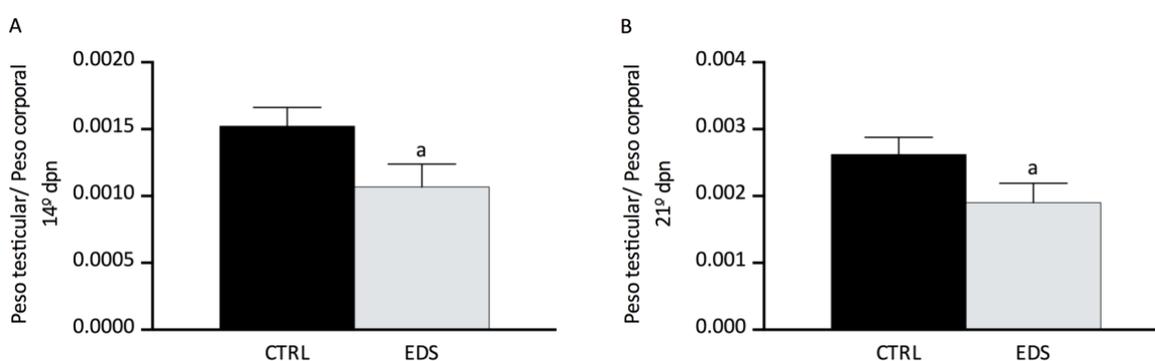
Em ambas as idades analisadas, o peso testicular diminuiu nos animais que receberam a administração de EDS (Figura 7A, B).



**Figura 7 – Peso testicular**

(A) Peso testicular no 14º dpn; n por grupo: CTRL (19) e EDS (11). (B) Peso testicular no 21º dpn; n por grupo: CTRL (22) e EDS (11). Dados apresentados como média  $\pm$  SEM. Teste t de *Student* para amostras não pareadas; <sup>a</sup> $p < 0,05$ . CTRL (controle); EDS (Etano-1,2-dimetilsulfonato); dpn (dia pós-natal).

A relação peso testicular/peso corporal também foi reduzida nos animais que receberam o EDS. Essa redução foi observada tanto no 14º como no 21º dpn (Figura 8A e B).



**Figura 8 – Relação peso testicular/peso corporal**

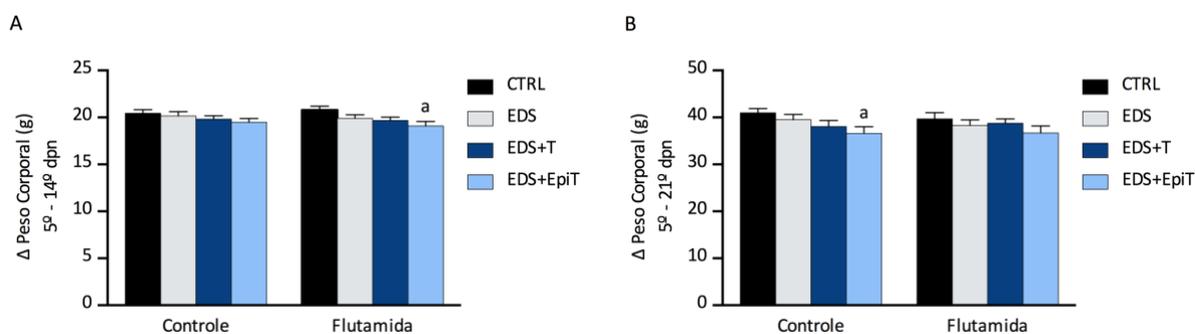
(A) Relação peso testicular/peso corporal no 14º dpn; n por grupo: CTRL (18) e EDS (09). (B) Relação peso testicular/peso corporal no 21º dpn; n por grupo: CTRL (18) e EDS (09). Dados apresentados como média  $\pm$  SEM. Teste t de *Student* para amostras não pareadas; <sup>a</sup> $p < 0,05$ . CTRL (controle); EDS (Etano-1,2-dimetilsulfonato); dpn (dia pós-natal).

## 6.2 Parâmetros de desenvolvimento

Os andrógenos estão envolvidos no desenvolvimento de diversos órgãos e tecidos. Assim, após a confirmação da castração química, foram analisados os efeitos do tratamento hormonal com ou sem flutamida sobre os parâmetros de desenvolvimento e o peso de órgãos sensíveis aos andrógenos.

### 6.2.1. Variação do peso corporal

A análise indicou que a variação do peso corporal entre o primeiro (5º dpn) e o último dia do protocolo experimental (14º ou 21º dpn) foi modificada pelo tratamento hormonal. Nos animais tratados com flutamida o grupo Flutamida-EDS+EpiT apresentou uma menor variação do peso corporal em relação ao grupo Flutamida-CTRL, no 14º dpn ( $F(3,142) = 3,73, p = 0,013$ , Figura 9A). Entretanto, no 21º dpn, houve uma redução na variação do peso corporal dos animais do grupo Controle-EDS+EpiT comparados ao Controle-CTRL ( $F(3,72) = 3,195, p = 0,028$ , Figura 9B). Não houve interação entre o tratamento hormonal e a flutamida ( $p > 0,05$ ).

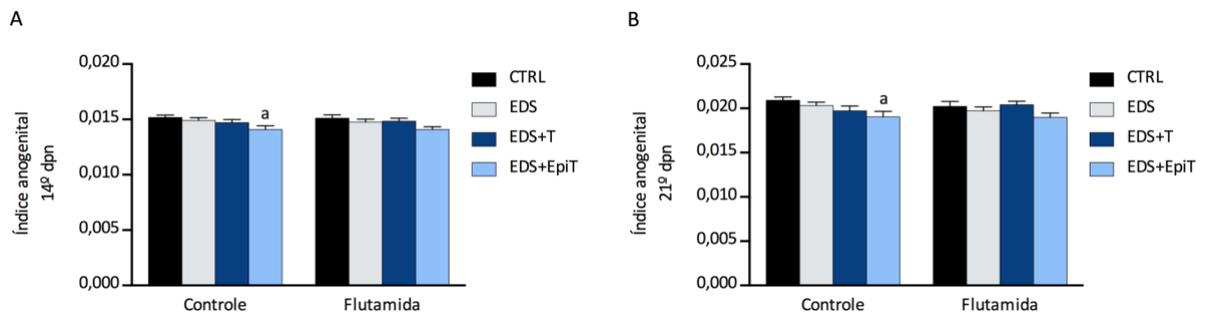


**Figura 9 - Variação do peso corporal**

(A) Variação do peso corporal entre o 5º e o 14º dpn; n por grupo: Controle-CTRL (33), Controle-EDS (18), Controle-EDS+T (17), Controle-EDS+EpiT (14), Flutamida-CTRL (17), Flutamida-EDS (17), Flutamida-EDS+T (17), Flutamida-EDS+EpiT (17). (B) Variação do peso corporal entre o 5º e o 21º dpn. n por grupo: Controle-CTRL (17), Controle-EDS (9), Controle-EDS+T (9), Controle-EDS+EpiT (7), Flutamida-CTRL (9), Flutamida-EDS (9), Flutamida-EDS+T (9), Flutamida-EDS+EpiT (9). Dados apresentados como média  $\pm$  SEM. ANOVA de duas vias seguida do pós-teste de Bonferroni; <sup>a</sup> $p < 0,05$  em relação ao CTRL. CTRL (controle); EDS (Etano-1,2-dimetilsulfonato); dpn (dia pós-natal); T (testosterona); EpiT (epitestosterona).

### 6.2.2 Índice anogenital

O tratamento hormonal teve efeito sobre o IAG que foi calculado a partir do peso corporal e da DAG. Os filhotes do grupo Controle-EDS+EpiT apresentaram um IAG menor em comparação aos do grupo CTRL, no 14º ( $F(3,144) = 5,301, p = 0,002$ , Figura 10A) e no 21º dpn ( $F(3,72) = 3,580, p = 0,018$ , Figura 10B). Não houve interação entre o tratamento hormonal e a flutamida ( $p > 0,05$ )

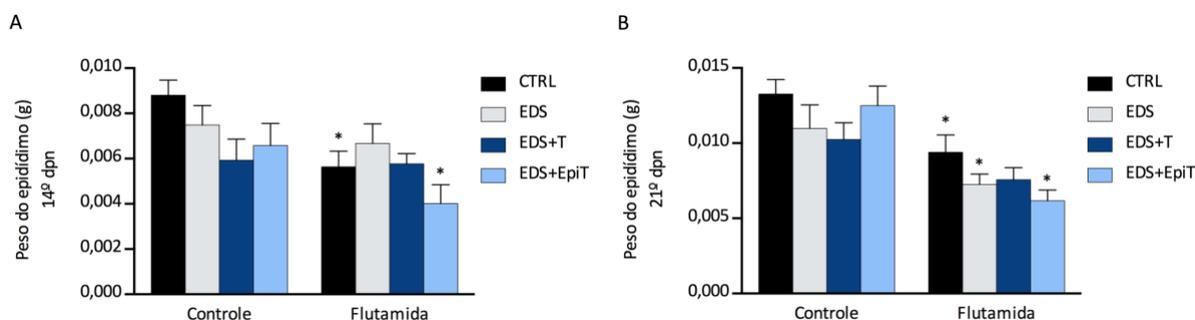


**Figura 10 – Índice anogenital**

(A) Índice anogenital no 14º dpn; n por grupo: Controle- (34), Controle-EDS (17), Controle-EDS+T (17), Controle-EDS+EpiT (15), Flutamida-CTRL (17), EDS (18), Flutamida-EDS+T (17), Flutamida-EDS+EpiT (17). (B) Índice anogenital no 21º dpn; n por grupo: Controle-CTRL (18), Controle-EDS (9), Controle-EDS+T (9), Controle-EDS+EpiT (8), Flutamida-CTRL (9), EDS (9), Flutamida-EDS+T (9), Flutamida-EDS+EpiT (9). Dados apresentados como média  $\pm$  SEM. ANOVA de duas vias seguida do pós-teste de Bonferroni; <sup>a</sup> $p < 0,05$  em relação ao CTRL. CTRL (controle); EDS (Etano-1,2-dimetilsulfonato); dpn (dia pós-natal); T (testosterona); EpiT (epitestosterona).

### 6.2.3 Peso de órgãos sensíveis à ação dos andrógenos

A flutamida teve efeito inibitório sobre o epidídimo reduzindo seu peso nos grupos Flutamida-CTRL e Flutamida-EDS+EpiT em relação aos seus respectivos controles, no 14º dpn ( $F(1,55) = 8,526, p = 0,005$ , Figura 11A) e no 21º dpn ( $F(1,60) = 28,868, p = 0,001$ , Figura 11B). No 21º dpn, o grupo Flutamida-EDS+T também apresentou redução no peso do epidídimo em relação ao seu controle sem flutamida (Controle-EDS+T), conforme mostrado na Figura 11B. Não houve interação entre os fatores ( $p > 0,05$ ).



**Figura 11 – Peso do epidídimo**

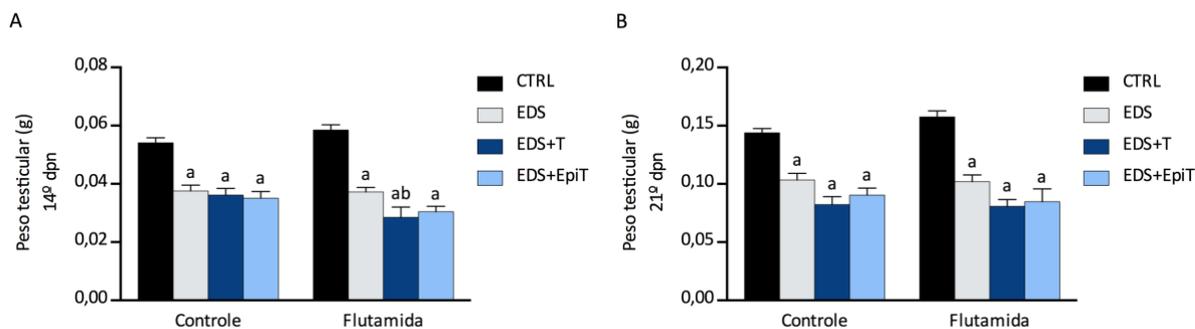
(A) Peso do epidídimo no 14<sup>o</sup> dpn; n por grupo: Controle-CTRL (13), Controle-EDS (8), Controle-EDS+T (6), Controle-EDS+EpiT (5), Flutamida-CTRL (8), Flutamida-EDS (6), Flutamida-EDS+T (8), Flutamida-EDS+EpiT (9). (B) Peso do epidídimo no 21<sup>o</sup> dpn. n por grupo: Controle-CTRL (15), Controle-EDS (7), Controle-EDS+T (8), Controle-EDS+EpiT (6), Flutamida-CTRL (7), Flutamida-EDS (9), Flutamida-EDS+T (8), Flutamida-EDS+EpiT (8). Dados apresentados como média  $\pm$  SEM. ANOVA de duas vias seguida do pós-teste de Bonferroni; \* $p < 0,05$  em relação ao controle. CTRL (controle); EDS (Etano-1,2-dimetilsulfonato); dpn (dia pós-natal); T (testosterona); EpiT (epitestosterona).

O peso úmido da próstata, dos rins, do fígado, do baço e do coração também foi avaliado mas não foi alterado nem pelo tratamento hormonal nem pela flutamida (dados não mostrados). Nestes tecidos o peso dos órgãos do grupo EDS+EpiT foi discretamente menor que o CTRL mas a análise estatística não mostrou diferença significativa ( $p > 0,05$ ).

#### 6.2.4 Desenvolvimento dos testículos

A análise estatística do peso testicular no 14<sup>o</sup> dpn revelou uma interação entre o tratamento hormonal e da flutamida ( $F(3,76) = 3,082$ ,  $p = 0,032$ ). Além disso, foi observado um efeito principal, do tratamento hormonal, que reduziu o peso testicular nos grupos EDS, EDS+T e EDS+EpiT em relação ao CTRL (controle e flutamida) e no grupo Flutamida-EDS+T em comparação ao grupo Flutamida-EDS ( $F(3,76) = 60,190$ ,  $p = 0,001$ , Figura 12A).

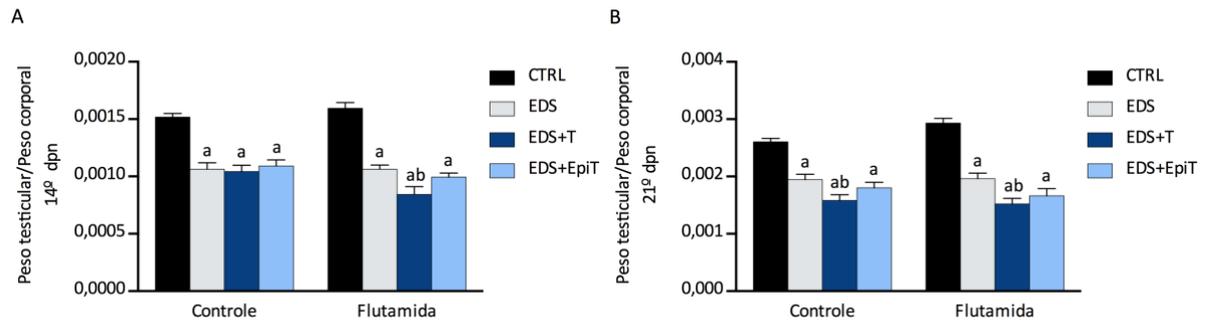
No 21<sup>o</sup> dpn não houve interação entre os fatores ( $p > 0,05$ ), mas o efeito do tratamento hormonal se manteve nos grupos EDS, EDS+T e EDS+EpiT em relação ao Controle-CTRL e Flutamida-CTRL ( $F(3,75) = 58,148$ ,  $p = 0,001$ , Figura 12B).



**Figura 12 - Peso testicular**

(A) Peso testicular no 14<sup>o</sup> dpn; n por grupo: Controle-CTRL (18), Controle-EDS (10), Controle-EDS+T (10), Controle-EDS+EpiT (9), Flutamida-CTRL (10), Flutamida-EDS (10), Flutamida-EDS+T (9), Flutamida-EDS+EpiT (8). (B) Peso testicular no 21<sup>o</sup> dpn; n por grupo: Controle-CTRL (18), Controle-EDS (10), Controle-EDS+T (9), Controle-EDS+EpiT (9), Flutamida-CTRL (10), Flutamida-EDS (9), Flutamida-EDS+T (9), Flutamida-EDS+EpiT (9). Dados apresentados como média  $\pm$  SEM. ANOVA de duas vias seguida do pós-teste de Bonferroni; <sup>a</sup> $p < 0,05$  em relação ao CTRL; <sup>b</sup> $p < 0,05$  em relação ao EDS. CTRL (controle); EDS (Etano-1,2-dimetilsulfonato); dpn (dia pós-natal); T (testosterona); EpiT (epitestosterona).

A relação peso testicular/peso corporal é um marcador do desenvolvimento testicular em relação ao crescimento corporal. A ANOVA de duas vias revelou que houve interação entre o tratamento hormonal e a flutamida sobre este parâmetro, no 14<sup>o</sup> ( $F(3,69) = 3,150, p = 0,030$ ) e no 21<sup>o</sup> dpn ( $F(3,73) = 2,803, p = 0,046$ ). O tratamento hormonal promoveu a redução da relação peso testicular/peso corporal nos ratos dos grupos EDS, EDS+T e EDS+EpiT em relação ao CTRL (Controle e Flutamida) no 14<sup>o</sup> dpn ( $F(3,69) = 73,808, p = 0,001$ , Figura 13A) e este efeito se manteve no 21<sup>o</sup> dpn ( $F(3,73) = 78,228, p = 0,001$ , Figura 13B). A relação peso testicular/peso corporal dos grupos Controle EDS+T (14<sup>o</sup> dpn) e Flutamida-EDS+T (14<sup>o</sup> e 21<sup>o</sup> dpn) foi reduzida quando comparada a do grupo EDS (Figura 13A e B).



**Figura 13 – Relação peso testicular/peso corporal**

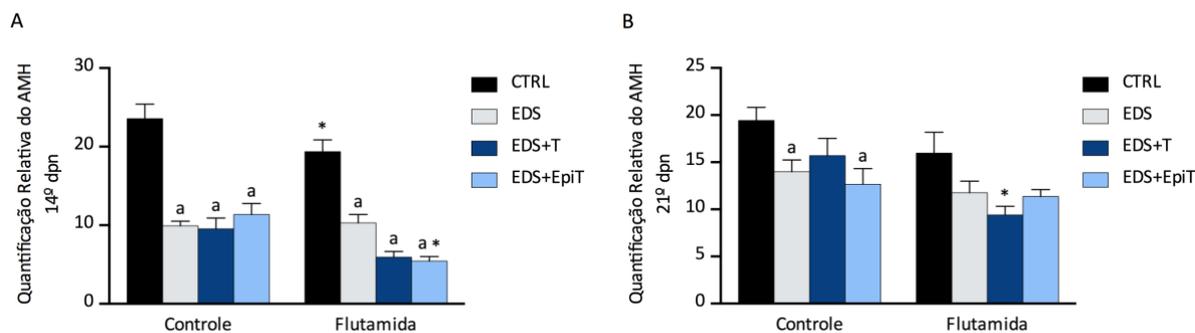
(A) Relação peso testicular/peso corporal no 14º dpn; n por grupo: Controle-CTRL (18), Controle-EDS (9), Controle-EDS+T (10), Controle-EDS+EpiT (8), Flutamida-CTRL (9), EDS (9), Flutamida-EDS+T (7), Flutamida-EDS+EpiT (7). (B) Relação peso testicular/peso corporal no 21º dpn.; n por grupo: Controle-CTRL (18), Controle-EDS (10), Controle-EDS+T (9), Controle-EDS+EpiT (9), Flutamida-CTRL (10), Flutamida-EDS (9), Flutamida-EDS+T (9), Flutamida-EDS+EpiT (7). Dados apresentados como média  $\pm$  SEM. ANOVA de duas vias seguida do pós-teste de Bonferroni; <sup>a</sup> $p < 0,05$  em relação ao CTRL; <sup>b</sup> $p < 0,05$  em relação ao EDS. CTRL (controle); EDS (Etano-1,2-dimetilsulfonato); dpn (dia pós-natal); T (testosterona); EpiT (epitestosterona).

### 6.3 Efeito do tratamento hormonal sobre o AMH e o AMHR2

#### 6.3.1 Quantificação comparativa do RNAm do AMH

A análise por qPCR revelou que a expressão do RNAm do AMH no 14º dpn foi modificada pelo tratamento hormonal ( $F(3,55) = 43,553$ ,  $p = 0,001$ ) e pela flutamida ( $F(1,55) = 9,794$ ,  $p = 0,003$ ), Figura 14B. Os grupos EDS, EDS+T, e EDS+EpiT apresentaram uma redução na expressão do AMH em comparação ao grupo CTRL, tanto no controle quanto no flutamida (Figura 14A). A expressão do AMH também se mostrou diminuída nos animais dos grupos Flutamida-CTRL e Flutamida-EDS+EpiT em relação aos animais Controle-CTRL e Controle-EDS+T (Figura 14A).

No 21º, o tratamento hormonal manteve a expressão do RNAm do AMH diminuída nos grupos Controle-EDS e Controle-EDS+EpiT ( $F(3,56) = 6,221$ ,  $p = 0,001$ , Figura 14B). O efeito da flutamida inibiu a expressão do AMH no grupo Flutamida-EDS+T. Não houve interação entre o tratamento hormonal e a flutamida ( $p > 0,05$ ).



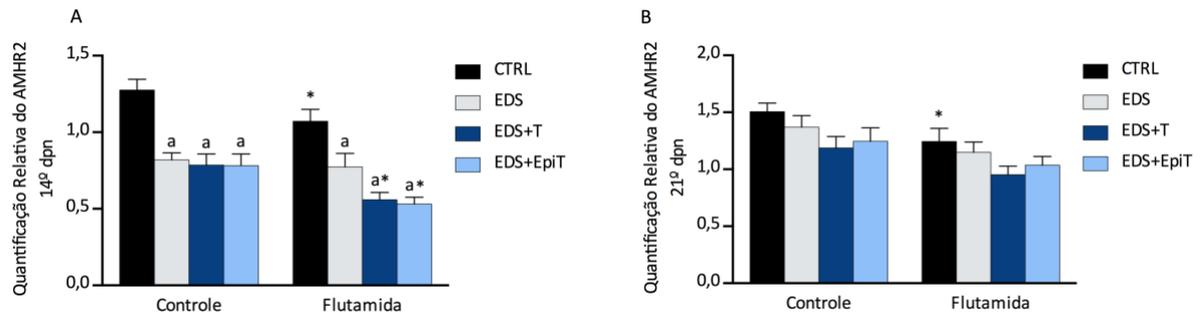
**Figura 14 – Quantificação relativa do RNAm do AMH**

(A) Quantificação relativa do RNAm do AMH no 14º dpn; n por grupo: Controle-CTRL (13), Controle-EDS (6), Controle-EDS+T (7), Controle-EDS+EpiT (8), Flutamida-CTRL (8), Flutamida-EDS (7), Flutamida-EDS+T (6), Flutamida-EDS+EpiT (8). (B) Quantificação relativa do RNAm do AMH no 21º dpn; n por grupo: Controle-CTRL (15), Controle-EDS (7), Controle-EDS+T (7), Controle-EDS+EpiT (7), Flutamida-CTRL (6), Flutamida-EDS (8), vEDS+T (6), Flutamida-EDS+EpiT (8). Dados apresentados como média ± SEM. ANOVA de duas vias seguida do pós teste de Bonferroni; <sup>a</sup> $p < 0,05$  em relação ao CTRL, \* $p < 0,05$  em relação ao controle. AMH (hormônio anti-mülleriano) CTRL (controle); EDS (Etano-1,2-dimetilsulfonato); dpn (dia pós-natal); T (testosterona); EpiT (epitestosterona).

### 6.3.2 Quantificação relativa do RNAm e do imunocontéudo do AMHR2

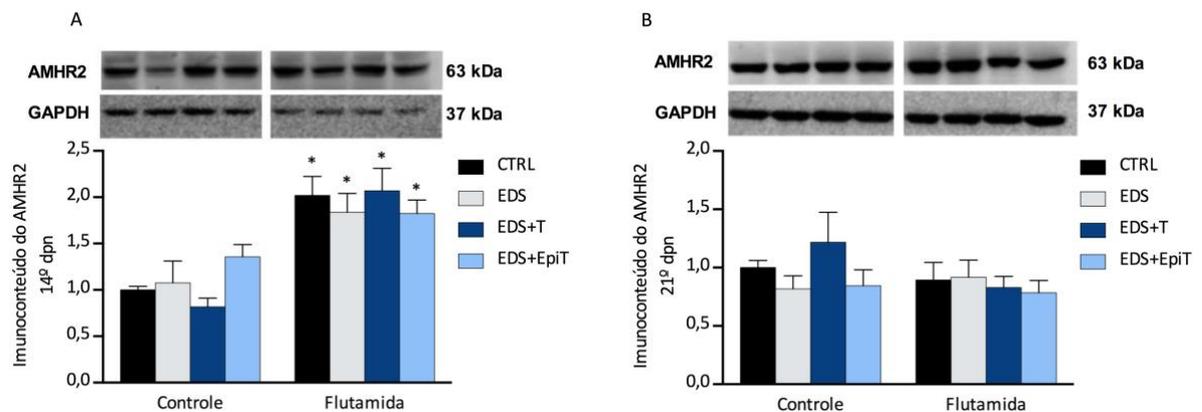
A expressão do RNAm do AMHR2 foi modificada pelos efeitos do tratamento hormonal e da flutamida, de forma semelhante à alteração observada na expressão do RNAm do AMH, no 14º dpn ( $F(3,61) = 24,139$ ,  $p = 0,001$ ;  $F(1,61) = 12,626$ ,  $p = 0,007$ , Figura 15A). A expressão do receptor foi inibida pelo tratamento hormonal nos grupos EDS, EDS+T, e EDS+EpiT (Controle e flutamida) em comparação ao Controle-CTRL e Flutamida-CTRL e pela flutamida nos grupos Flutamida-CTRL, Flutamida-EDS+T e Flutamida-EDS+EpiT. A análise por *Western blot* mostrou que o tratamento hormonal promoveu uma elevação do imunocontéudo do AMHR2 nos filhotes Flutamida-CTRL, Flutamida-EDS, Flutamida-EDS+T, e Flutamida-EDS+EpiT em comparação ao Flutamida-CTRL ( $F(1,36) = 57,584$ ,  $p = 0,001$ , Figura 16A).

No 21º dpn, a expressão do AMHR2 no grupo Flutamida-CTRL foi inibida pelo efeito da flutamida ( $F(1,62) = 11,292$ ,  $p = 0,001$ , Figura 15B). O imunocontéudo do receptor, entretanto, não foi modificado nem pelo tratamento nem pela flutamida (Figura 16B). Não houve interação entre o tratamento hormonal e a flutamida ( $p > 0,05$ ).



**Figura 15 - Quantificação relativa do RNAm do AMHR2**

Quantificação relativa do RNAm do AMHR2 no 14º dpn. n por grupo: Controle-CTRL (15), Controle-EDS (8), Controle-EDS+T (7), Controle-EDS+EpiT (8), Flutamida-CTRL (7), Flutamida-EDS (8), Flutamida-EDS+T (8), Flutamida-EDS+EpiT (8). (B) Quantificação relativa do RNAm do AMHR2 no 21º dpn. n por grupo: Controle-CTRL (16), Controle-EDS (8), Controle-EDS+T (8), Controle-EDS+EpiT (8), Flutamida-CTRL (7), Flutamida-EDS (8), Flutamida-EDS+T (7), Flutamida-EDS+EpiT (8). Dados apresentados como média  $\pm$  SEM. ANOVA de duas vias seguida do pós-teste de Bonferroni; <sup>a</sup> $p < 0,05$  em relação ao CTRL; \* $p < 0,05$  em relação ao controle. AMHR2 (receptor tipo 2 do hormônio anti-mülleriano); CTRL (controle); EDS (Etano-1,2-dimetilsulfonato); dpn (dia pós-natal); T (testosterona); EpiT (epitestosterona).

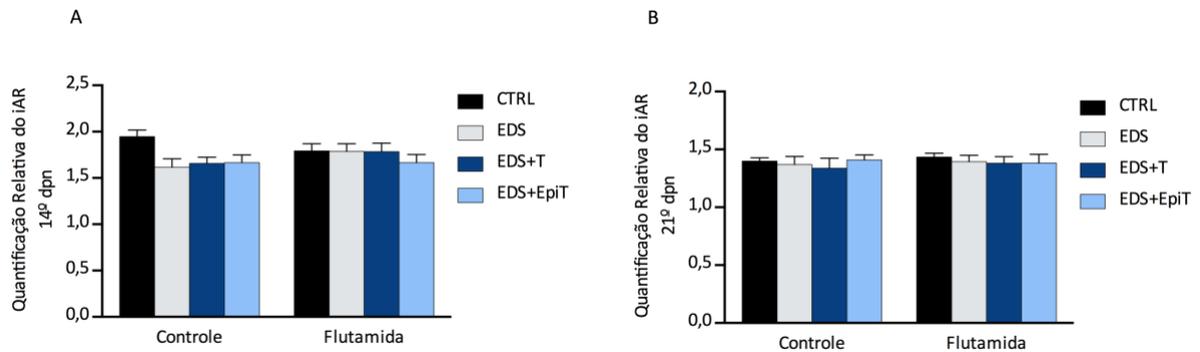


**Figura 16 - Imunoconteúdo do AMHR2**

(A) Imunoconteúdo do AMHR2 no 14º dpn. n por grupo: Controle-CTRL (10), Controle-EDS (5), Controle-EDS+T (4), Controle-EDS+EpiT (5), Flutamida-CTRL (5), Flutamida-EDS (5), EDS+T (5), Flutamida-EDS+EpiT (5). (B) Imunoconteúdo do AMHR2 no 21º dpn. n por grupo: Controle-CTRL (12), Controle-EDS (5), Controle-EDS+T (5), Controle-EDS+EpiT (5), Flutamida-CTRL (4), Flutamida-EDS (6), EDS+T (5), Flutamida-EDS+EpiT (4). Dados apresentados como média  $\pm$  SEM. ANOVA de duas vias seguida do pós-teste de Bonferroni. \* $p < 0,05$  em relação ao controle. AMHR2 (receptor tipo 2 do hormônio anti-mülleriano); CTRL (controle); EDS (Etano-1,2-dimetilsulfonato); dpn (dia pós-natal); T (testosterona); EpiT (epitestosterona).

#### 6.4 Quantificação relativa do RNAm e do imunoconteúdo de iAR

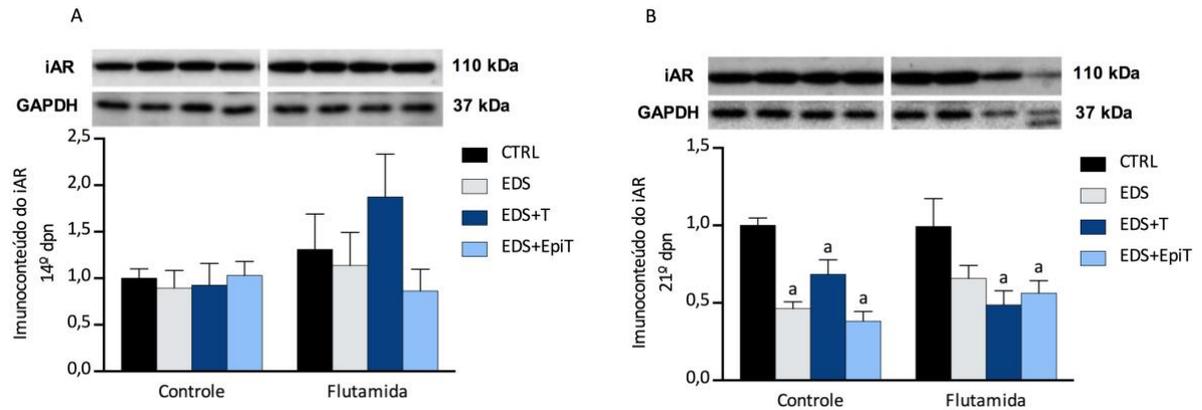
O tratamento hormonal e a flutamida não alteraram a expressão do RNAm e o imunoconteúdo do iAR no 14<sup>o</sup> dpn (Figura 17A e Figura 18A).



**Figura 17 - Quantificação relativa do RNAm do iAR**

(A) Quantificação relativa do RNAm do iAR no 14<sup>o</sup> dpn; n por grupo: Controle-CTRL (16), Controle-EDS (8), Controle-EDS+T (8), Controle-EDS+EpiT (8), Flutamida-CTRL (7), EDS (8), Flutamida-EDS+T (8), Flutamida-EDS+EpiT (8). (B) Quantificação relativa do RNAm do iAR no 21<sup>o</sup> dpn; n por grupo: Controle-CTRL (16), Controle-EDS (7), Controle-EDS+T (8), Controle-EDS+EpiT (8), Flutamida-CTRL (8), Flutamida-EDS (8), Flutamida-EDS+T (7), Flutamida-EDS+EpiT (8). Dados apresentados como média  $\pm$  SEM. CTRL (controle); EDS (Etano-1,2-dimetilsulfonato); dpn (dia pós-natal); iAR (receptor intracelular de andrógenos); T (testosterona); EpiT (epitesterona).

No 21<sup>o</sup> dpn, o tratamento hormonal teve efeito somente sobre o imunoconteúdo do iAR ( $F(3,38) = 15,583$ ,  $p = 0,000$ , Figura 18B) que foi menor nos animais Controle-EDS, Controle-EDS+T, Controle-EDS+EpiT em relação ao Controle-CTRL e nos grupos Flutamida-EDS+T e Flutamida EDS+EpiT em comparação ao Flutamida-CTRL. Não houve interação entre os fatores ( $p > 0,05$ ).

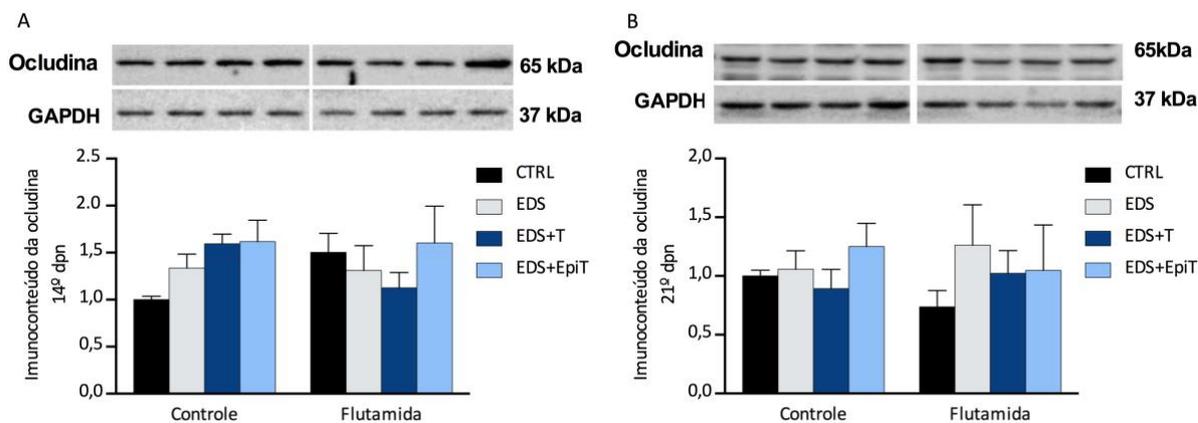


**Figura 18 - Imunoconteúdo do iAR**

(A) Imunoconteúdo do iAR no 14º dpn; n por grupo: Controle-CTRL (10), Controle-EDS (4), Controle-EDS+T (4), Controle-EDS+EpiT (5), Flutamida-CTRL (5), Flutamida-EDS (4), Flutamida-EDS+T (4), Flutamida-EDS+EpiT (4). (B) Imunoconteúdo do iAR no 21º dpn; n por grupo: Controle-CTRL (12), Controle-EDS (5), Controle-EDS+T (6), Controle-EDS+EpiT (4), Flutamida-CTRL (4), Flutamida-EDS (5), Flutamida-EDS+T (5), Flutamida-EDS+EpiT (5). Dados apresentados como média  $\pm$  SEM. ANOVA de duas vias seguida do pós-teste de Bonferroni.  $^a p < 0,05$  em relação ao CTRL. CTRL (controle); EDS (Etano-1,2-dimetilsulfonato); dpn (dia pós-natal); iAR (receptor intracelular de andrógenos); T (testosterona); EpiT (epitestosterona).

## 6.5 Imunoconteúdo da ocludina

O tratamento hormonal e a flutamida não alteraram o imunoconteúdo da ocludina (Figura 19A e B,  $p > 0,05$ ).

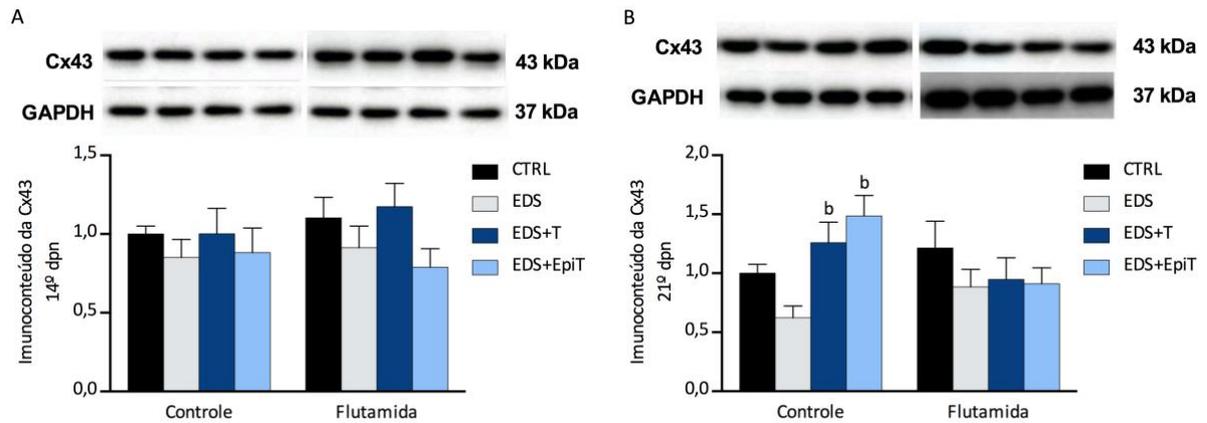


**Figura 19 – Imunoconteúdo da ocludina**

A) Imunoconteúdo da ocludina no 14<sup>o</sup> dpn; n por grupo: Controle-CTRL (10), Controle-EDS (4), Controle-EDS+T (5), Controle-EDS+EpiT (4), Flutamida-CTRL (5), Flutamida-EDS (5), Flutamida-EDS+T (4), Flutamida-EDS+EpiT (5). B) Imunoconteúdo da ocludina no 21<sup>o</sup> dpn; n por grupo: Controle-CTRL (12), Controle-EDS (5), Controle-EDS+T (5), Controle-EDS+EpiT (6), Flutamida-CTRL (5), Flutamida-EDS (5), Flutamida-EDS+T (5), Flutamida-EDS+EpiT (5). Dados apresentados como média  $\pm$  SEM. ANOVA de duas vias seguida do pós-teste de Bonferroni. <sup>b</sup> $p < 0,05$  em relação ao EDS. CTRL (controle); EDS (Etano-1,2-dimetilsulfonato); dpn (dia pós-natal); T (testosterona); EpiT (epitestosterona).

## 6.6 Imunoconteúdo da CX43

Não houve alteração do imunoconteúdo da Cx43 no 14<sup>o</sup> dpn (Figura 20A,  $p > 0,05$ ). Nos filhotes no 21<sup>o</sup> dpn a análise mostrou uma interação entre os efeitos do tratamento hormonal e da flutamida ( $F(3,39) = 3,709$ ,  $p = 0,019$ ). Além disso, o tratamento hormonal promoveu um aumento do imunoconteúdo da Cx43 nos grupos Controle-EDS+T e Controle-EDS+EpiT em relação ao Controle-EDS ( $F(3,39) = 3,312$ ,  $p = 0,030$ , Figura 20B). Não houve interação entre o tratamento hormonal e a flutamida ( $p > 0,05$ ).



**Figura 20 - Imunoconteúdo da Cx43**

(A) Imunoconteúdo da Cx43 no 14<sup>o</sup> dpn; n por grupo: Controle-CTRL (12), Controle-EDS (6), Controle-EDS+T (5), Controle-EDS+EpiT (4), Flutamida-CTRL (5), Flutamida-EDS (4), Flutamida-EDS+T (5), Flutamida-EDS+EpiT (4). (B) Imunoconteúdo da Cx43 no 21<sup>o</sup> dpn; n por grupo: Controle-CTRL (12), Controle-EDS (5), Controle-EDS+T (5), Controle-EDS+EpiT (5), Flutamida-CTRL (4), Flutamida-EDS (5), Flutamida-EDS+T (6), Flutamida-EDS+EpiT (5). Dados apresentados como média  $\pm$  SEM. ANOVA de duas vias seguida do pós-teste de Bonferroni. <sup>b</sup> $p < 0,05$  em relação ao EDS. Cx (conexina); CTRL (controle); EDS (Étano-1,2-dimetilsulfonato); dpn (dia pós-natal); T (testosterona); EpiT (epitestosterona).

## 7 DISCUSSÃO

Muitos fatores estão envolvidos na regulação do desenvolvimento testicular e na maturação sexual. Este estudo teve por objetivo avaliar a ação da testosterona e da epitestosterona sobre diversos parâmetros de desenvolvimento testicular, incluindo níveis de AMH e seu receptor, níveis do iAR e componentes da BHT. Com este intuito, foi realizada a administração dos hormônios testosterona ou epitestosterona em um modelo animal de castração química. O modelo utiliza a administração de EDS, um agente alquilante específico que promove a apoptose das células de Leydig (JACKSON; JACKSON, 1984). Dessa forma, a administração de 100 mg/kg de EDS inibe a produção endógena de testosterona em ratos neonatos em 24 horas, sem ocasionar outros danos ao animal (KERR; RISBRIDGER; KNELL, 1988; MA; HUANG; DONG, 2013; RISBRIDGER; KERR; DE KRETZER, 1989; SU et al., 2018). Além disso, os modelos experimentais de castração química com antagonistas do GnRH suprimem a liberação do LH, mas não inibem completamente os andrógenos testiculares e ainda reduzem a secreção de FSH em 50% (SMITH; O'SHAUGHNESSY; REBOURCET, 2015; TEERDS; RIJNTJES, 2007). Por esta razão, o modelo de castração química com EDS é a forma mais eficaz para avaliar as ações dos andrógenos no desenvolvimento testicular de ratos. A reposição hormonal foi realizada com 2,5 mg/kg/dia de testosterona ou epitestosterona pois estudos com animais imaturos apontam que esta dose de testosterona promove satisfatória infiltração do hormônio nos testículos sem alterar a secreção de FSH (WALCZAK-JEDRZEJOWSKA et al., 2010, 2011). Tanto o mecanismo de ação clássico como o não clássico dependente de iAR são bloqueados pelo fármaco flutamida, um antiandrógeno, não esteroide. A flutamida é utilizada para avaliar o papel do iAR em processos biológicos pois, ao ligar-se ao iAR, altera sua conformação impedindo a ligação dos andrógenos (ORAFIDIYA; MONAGHAN; MCEWAN, 2018).

A associação da flutamida com a castração química (EDS) e a reposição hormonal tiveram por finalidade identificar os efeitos clássicos e não clássicos dependentes de iAR e não clássicos, independentes do iAR, da testosterona e da epitestosterona. A fim de avaliar os eventos que ocorrem ao longo do processo de desenvolvimento testicular, os efeitos do tratamento hormonal com ou sem associação com flutamida foram avaliados em duas etapas do desenvolvimento: no 14<sup>o</sup> dpn, fase imatura, período em que as células de Sertoli estão finalizando sua fase proliferativa e a BHT ainda não está formada; e no 21<sup>o</sup> dpn, fase de maturação, período em que as células de Sertoli pararam de proliferar e estão se diferenciando,

a BHT já está estabelecida e as células germinativas iniciaram as divisões meióticas dando início ao primeiro ciclo espermatogênico.

O EDS apresenta citotoxicidade específica para as células de Leydig (mais detalhes ver ANEXO 1). A exposição ao EDS (120 mg/kg – dose única) em ratos no 5º dpn, leva à apoptose das células de Leydig fetais dois dias após a administração, a qual é acompanhada da redução da concentração sérica e testicular de testosterona (KERR; RISBRIDGER; KNELL, 1988; RISBRIDGER; KERR; DE KRETZER, 1989). A efetividade da ação do EDS neste estudo foi confirmada através da dosagem sérica de testosterona (realizada no estudo-piloto), e da avaliação de parâmetros de desenvolvimento influenciados pela ação dos andrógenos, tais como peso corporal, peso testicular e relação peso testicular/peso corporal. No estudo-piloto, 3 dias após a administração do EDS, os animais apresentaram concentração sérica de testosterona inferior ao limite de detecção do ensaio. Quando comparados somente os animais dos grupos CTRL e EDS observamos que a castração dos ratos neonatos não teve efeito sobre o ganho de peso corporal, mas reduziu o peso testicular e a relação peso testicular/peso corporal, no 14º e 21º dpn, assim como observado em estudos prévios (SU et al., 2018). Nos estudos realizados por Su, Teerds e colaboradores, o peso testicular e a concentração sérica de testosterona, diminuíram após a exposição dos neonatos ao EDS, mas retornam a valores semelhantes aos dos controles no 21º dpn, em decorrência da diferenciação das células de Leydig progenitoras (SU et al., 2018; TEERDS; RIJNTJES, 2007). No presente trabalho, o peso testicular e a relação peso testicular/peso corporal se mantiveram diminuídos no 21º dpn nos animais castrados. A administração de uma segunda dose de EDS (100 mg/kg), no 14º dpn, manteve a castração até o 21º dpn. Desta forma, concluímos que o EDS, na dose de 100 mg/kg de peso corporal, foi eficaz em realizar a castração química eliminando a produção endógena de andrógenos sem causar dano aos filhotes. Ademais, ao longo de todo o estudo, não houve perda de animais.

Além de seus efeitos nos tecidos reprodutivos, os andrógenos estimulam o desenvolvimento de outros tecidos como encéfalo, rins, adrenais, fígado, baço, coração, ossos, músculo esquelético, pele e tecido adiposo, promovendo efeitos anabólicos no desenvolvimento e, conseqüentemente, influenciando na composição e na massa corporal (GENTRY; WADE, 1976). Em ratos, o peso corporal aumenta gradualmente durante o desenvolvimento sendo o ganho de peso mais intenso a partir do 18º dpn (PICUT et al., 2015). No presente trabalho não foi observada variação no ganho de peso corporal dos animais

castrados e tratados com testosterona com ou sem associação com a flutamida. Da mesma forma, um estudo anterior do nosso laboratório, não observou diferença no ganho de peso entre os grupos tratados (entre o 7º e o 14º dpn) somente com epitestosterona, ou com testosterona em associação com um antagonista do GnRH (Cetrorelix - 500 µg/kg) (CAVALARI et al., 2018). O mesmo resultado foi observado em animais tratados com flutamida do 21º ao 44º dpn (PEROBELLI et al., 2012). Entretanto, outros estudos mostraram que ratos púberes castrados ou tratados com flutamida por 4 semanas apresentaram redução no ganho de peso corporal que foi revertida quando os animais castrados foram tratados com testosterona (JANSSON; EDEN; ISAKSSON, 1983; PAZOS et al., 2000). Essa discrepância com nossos achados pode ser devido a diferença na idade dos animais e na duração do tratamento.

Entretanto, nosso estudo mostra que o ganho de peso corporal dos filhotes foi atenuado pelo tratamento hormonal com epitestosterona. Resultado semelhante ao observado em camundongos adultos castrados e tratados com testosterona ou com testosterona e epitestosterona por 3 semanas. O ganho de peso dos animais que receberam testosterona em associação com epitestosterona foi menor do que o do grupo que recebeu somente testosterona (STÁRKA et al., 1991; STÁRKA; BIČÍKOVÁ; HAMPL, 1989). Estes dados apontam para um efeito antiandrogênico da epitestosterona sobre o ganho de peso corporal.

A DAG e o IAG são usados como parâmetros indicadores, não invasivos, da ação androgênica sobre o desenvolvimento (RHEES et al., 1997). A DAG é influenciada pela exposição aos andrógenos, principalmente no período fetal, durante a janela de programação da masculinização (VAN DEN DRIESCHE et al., 2011), apresentando pequena plasticidade aos andrógenos após o nascimento e na vida adulta (WELSH et al., 2008). De acordo com Perobelli (2013), a administração de flutamida a ratos neonatos não promoveu alteração da DAG no 8º e no 25º dpn, mas foi reduzida em animais expostos à flutamida no período pré-natal (PEROBELLI et al., 2013). Uma vez que a DAG aumenta com a idade, assim como, o crescimento corporal, utiliza-se com frequência o IAG que divide a DAG (em mm) pela raiz cúbica do peso corporal (em g) (GALLAVAN et al., 1999). Observamos que a reposição com epitestosterona reduziu o IAG, o que aponta para um possível efeito antiandrogênico. Neste trabalho a castração química e o bloqueio do iAR pela flutamida não modificaram a DAG e o IAG provavelmente porque os animais foram castrados e receberam a flutamida no final do período neonatal e no período infantil quando a plasticidade da DAG já está reduzida.

O epidídimo é um túbulo longo formado por distintos tipos celulares que tem como função principal prover um microambiente necessário para a maturação final e o armazenamento dos espermatozoides (ROBERTS; CHAUVIN, 2018). O crescimento, a diferenciação e a função do epidídimo são mediados pelos andrógenos provenientes da circulação sistêmica e do fluido tubular (LUETJENS; WEINBAUER, 2018; SUN; FLICKINGER, 1979) e envolvem uma complexa intercomunicação entre as diferentes células epididimais (SULLIVAN; BELLEANNÉE, 2018). Enquanto a DHT é responsável pela manutenção da estrutura e funcionamento do epidídimo no adulto, seu desenvolvimento é mediado pela testosterona através do iAR (HEJMEJ; BILINSKA, 2018; SCHULTZ; WILSON, 1974). Conforme Sun e Flickinger (1979), o desenvolvimento pós-natal do epidídimo compreende três períodos: a fase indiferenciada, do nascimento ao 15º dpn, é um período relativamente quiescente, a fase de diferenciação (16º ao 44º dpn) é marcada pela rápida proliferação e diferenciação celular, e a fase de expansão, após o 44º dpn, quando o diâmetro do epidídimo aumenta e este túbulo é preenchido por espermatozoides (PICUT; ZIEJEWSKI; STANISLAUS, 2018; SUN; FLICKINGER, 1979). A fase indiferenciada é pouco vulnerável a variações nos níveis séricos dos andrógenos (PICUT; ZIEJEWSKI; STANISLAUS, 2018) já as fases de diferenciação e expansão são controladas pela testosterona proveniente da circulação sistêmica e do fluido tubular que começa a ser secretado no início da fase de diferenciação (PICUT; ZIEJEWSKI; STANISLAUS, 2018).

O desenvolvimento e a função do epidídimo são comprometidos por qualquer fator que altere a ação da testosterona mediada pelo iAR nestas fases podendo resultar em comprometimento qualitativo e quantitativo da fertilidade (PEROBELLI et al., 2012). Estudos confirmam a presença de vários genes regulados pelo iAR no epidídimo (SUTINEN; MALINEN; PALVIMO, 2017) e a deficiência de testosterona no período de diferenciação resulta em apoptose e redução do tamanho e do peso do epidídimo (PICUT; ZIEJEWSKI; STANISLAUS, 2018). O peso de órgãos sensíveis aos andrógenos é um parâmetro para avaliação do efeito de antiandrogênico no período puberal (PEROBELLI et al., 2012). No presente estudo, o peso do epidídimo foi reduzido pelo efeito da flutamida nos animais CTRL reforçando a dependência do iAR no desenvolvimento deste órgão. Em ratos pré-púberes tratados com flutamida, Perobelli et al. (2013) observaram redução no peso do epidídimo no período puberal. No entanto, além do efeito antagônico da flutamida, promovido pelo bloqueio do iAR, observou-se também uma redução da imunorreatividade ao iAR no epidídimo (PEROBELLI et al., 2013). No presente estudo a avaliação do peso do epidídimo foi realizada em duas fases distintas do

desenvolvimento deste órgão, no 14º dpn final da fase indiferenciada e no 21º dpn fase de diferenciação. O resultado que observamos nos animais castrados tratados com flutamida sem reposição hormonal corresponde à estas fases de desenvolvimento do epidídimo. No 14º dpn, apesar do bloqueio do iAR e da ausência dos andrógenos, o peso do epidídimo não foi alterado devido a natureza quiescente desta fase. Por outro lado, a ausência dos efeitos da testosterona mediados pelo iAR comprometeu o desenvolvimento do epidídimo ao 21º dpn, em sua fase de diferenciação.

Embora a análise estatística não tenha apontado efeito do tratamento hormonal, os grupos tratados com epitestosterona em associação com a flutamida apresentaram menor crescimento do epidídimo. Um dos mecanismos pelos quais a epitestosterona atua como antagonista dos andrógenos é através da redução da atividade da enzima 5 $\alpha$ -redutase que converte testosterona em DHT (NUCK; LUCKY, 1987). Entretanto, o desenvolvimento do epidídimo é mediado pela testosterona de forma que a expressão e o imunoconteúdo da 5 $\alpha$ -redutase são reduzidas neste período (VIGER; ROBAIRE, 1992, 1994). A partir destes achados é possível supor que a flutamida estimule a expressão e/ou a atividade da enzima 17 $\alpha$ -HSD, aumentando a síntese de epitestosterona ao mesmo tempo em que inibe a expressão e/ou a atividade da enzima 17 $\beta$ -HSD reduzindo a síntese de testosterona. Conseqüentemente, haveria um comprometimento do desenvolvimento do órgão através de um efeito antiandrogênico da epitestosterona mediado pelo mecanismo de ação não clássico, independente de iAR. De fato, dados recentes sugerem que a ação dos andrógenos no epidídimo pode ocorrer também pelo mecanismo não clássico (ROBERTS; CHAUVIN, 2018). A exposição a DHT por 1 minuto promoveu a ativação da via SRC/MAPK (RAS, MEK, ERK1/2)/CREB em células epididimais imortalizadas (PC-1). Entretanto, este efeito não foi observado na presença da hidroxiflutamida (HAMZEH; ROBAIRE, 2011). Estudos indicam que além do seu efeito como antagonista dos andrógenos a hidroxiflutamida pode se ligar ao iAR e atuar como um agonista, modulando vias de sinalização dependentes de proteínas cinases (CHOJNACKA et al., 2016). Estes achados e os observados no presente estudo sugerem que os efeitos dos andrógenos no epidídimo podem ser mediados também pelo mecanismo de ação não clássico, dependente e independente de iAR.

O peso/volume testicular, reflete a quantidade de células presente nas gônadas e, embora ainda pouco utilizado, é um marcador clínico não invasivo da função testicular (GRINSPON; URRUTIA, 2020). A redução no peso testicular e na relação peso testicular/peso

corporal observada nos animais castrados com EDS é, em parte, resultado da diminuição do número celular devido a ausência das células de Leydig e, possivelmente, da redução do número de células de Sertoli.

O peso testicular, assim como a capacidade espermatogênica do adulto, dependem do número de células de Sertoli originado durante o desenvolvimento testicular, uma vez que este influencia diretamente o número de células germinativas e de células de Leydig (REBOURCET et al., 2017). Sendo assim, a composição celular e o peso testicular são resultantes da ação do FSH que é o principal fator estimulante da proliferação das células de Sertoli. A secreção do FSH é modulada por ativinas e inibinas que além de seus efeitos autócrinos e parácrinos nas gônadas também atuam como hormônios regulando a secreção de FSH pelo eixo HHG (LOVELAND; HEDGER, 2015; NAMWANJE; BROWN, 2016). No período fetal e pós-natal, a ativina A é secretada pelas células de Sertoli, pelas células peritubulares e pelas as células de Leydig fetais e promove a proliferação das células de Sertoli de forma direta e, indireta, estimulando a secreção do FSH (ARCHAMBEAULT; YAO, 2010; BARAKAT et al., 2008). Os resultados que observamos nos animais castrados indicam que a redução da ativina A atenuou o efeito estimulatório comprometendo a proliferação das células de Sertoli. O crescimento testicular se manteve reduzido nos filhotes castrados que receberam reposição hormonal reforçando a hipótese de que a redução do peso testicular ocorreu pela ausência das células de Leydig em si mas também pela redução do número de células de Sertoli em decorrência da redução da ativina A e do FSH. Estudos anteriores confirmam que a redução da ação da ativina A e do FSH no período neonatal resulta em diminuição do número de células de Sertoli, do tamanho testicular e da fertilidade (ARCHAMBEAULT; YAO, 2010; BUZZARD et al., 2004).

A flutamida não alterou o crescimento testicular dos animais CTRL. Em outros dois estudos filhotes tratados ou expostos à flutamida por via materna apresentaram diminuição no número de células de Sertoli e, conseqüentemente, redução no peso testicular (ATANASSOVA et al., 2005; AUHAREK et al., 2010). Essa discrepância nos resultados pode ser devida à diferença no período de exposição à flutamida. A taxa de proliferação das células de Sertoli atinge o pico máximo no final do período fetal e após o nascimento diminui progressivamente (CLERMONT; PEREY, 1957; ORTH, 1982). Nestes estudos os filhotes foram expostos à flutamida desde o início do período neonatal quando a taxa de proliferação das células de Sertoli está elevada enquanto, no nosso estudo o tratamento com flutamida iniciou somente ao final do período neonatal quando a taxa de proliferação já está reduzindo.

Nos animais que receberam testosterona em associação com a flutamida, durante a fase proliferativa, a redução do crescimento testicular foi mais intensa do que a observada nos animais castrados que receberam somente flutamida. A expressão do iAR nas células de Sertoli inicia no período neonatal quando a concentração intratesticular de testosterona está reduzida (EDELSZTEIN; REY, 2019). Neste estudo, realizamos a administração de testosterona a partir do 6º dpn, o que pode ter resultado em uma elevação precoce da concentração intratesticular de testosterona alterando o balanço hormonal envolvido na modulação do desenvolvimento testicular resultando em inibição precoce da proliferação e acelerando a maturação das células de Sertoli. Nossos achados, sugerem que a redução do crescimento testicular nos animais castrados com reposição de testosterona foi mais intensa pois além da ausência das células de Leydig e da redução do efeito estimulatório da ativina A e do FSH, houve também a inibição precoce da proliferação, mesmo estando o iAR bloqueado pela flutamida. Segundo as evidências disponíveis até o momento, este efeito da testosterona, independente de iAR, pode estar envolvido na modulação da maturação testicular e ser mediado por um receptor de membrana, como o ZIP9 (BULLDAN et al., 2016).

No período embrionário, o AMH, secretado pelas células de Sertoli imaturas promove a regressão dos ductos de Müller no entanto, o AMH está envolvido na regulação de outros processos biológicos uma vez que continua sendo secretado após o nascimento (AL-ATTAR et al., 1997). O papel fisiológico e os mecanismos moleculares envolvidos na modulação da secreção do AMH no período pós-natal ainda não são totalmente conhecidos. Durante o período fetal-neonatal a secreção do AMH é estimulada pelo FSH de dois modos: diretamente, ativando genes que aumentam a expressão do AMH e indiretamente, estimulando a proliferação das células de Sertoli (LUKAS-CROISIER et al., 2003). Na puberdade, a secreção do AMH é inibida por um efeito sinérgico entre o aumento na expressão de iAR nas células de Sertoli, da concentração intratesticular de testosterona e da entrada dos espermatócitos em meiose (REY et al., 2009). O gene promotor do AMH não possui ARE (XU et al., 2019) de maneira que testosterona inibe a transcrição do AMH de forma indireta modulando a expressão ou atividade de fatores de transcrição e/ou através de outras células testiculares como as células peritubulares e as células de Leydig (CLEMENTE et al., 2018). Na fase inicial do desenvolvimento o FSH estimula a transcrição do AMH através da ativação de Sox9, SF1, GATA e, principalmente, NF-kB (SANSONE et al., 2019). Entretanto, à medida que se aproxima da puberdade, a produção de AMH é inibida pois o efeito inibitório da testosterona/iAR na transcrição de NF-kB se

sobrepõe ao efeito estimulatório do FSH (revisado em (URRUTIA; GRINSPON; REY, 2019). Sendo assim, a síntese do AMH resulta do balanço entre o efeito estimulatório do FSH e o efeito inibitório da testosterona via iAR (SANSONE et al., 2019).

Neste estudo, observamos um efeito inibitório sobre a expressão de AMH nos animais castrados que não foi modificado com a reposição hormonal. A inibição do AMH nos animais que receberam testosterona poderia ser explicada pela indução precoce da maturação, porém, este efeito também foi observado nos animais castrados e castrados com reposição de epitestosterona. É possível que a redução na expressão do AMH seja decorrente do menor número de células de Sertoli resultante da inibição do efeito estimulatório da ativina A e do FSH.

O AMH é um importante modulador da esteroidogênese contrapondo o efeito estimulatório do LH (LEE, 2000), modulando a função das células de Leydig fetais e, o desenvolvimento e a função das células de Leydig progenitoras (ROUILLER-FABRE et al., 1998). O AMH modula as enzimas esteroidogênicas influenciando nos andrógenos sintetizados em cada fase do desenvolvimento. No imaturo, o AMH inibe a atividade enzimática reduzindo a biossíntese de testosterona pelas células de Leydig fetais e a de estradiol pelas células de Sertoli imaturas contribuindo para a manutenção da imaturidade sexual (ROUILLER-FABRE et al., 1998) e com a aproximação da puberdade o AMH inibe a proliferação e estimula a diferenciação das células de Leydig progenitoras (WU et al., 2005).

A expressão do RNAm do AMH foi inibida pelo efeito da flutamida nos animais castrados com reposição de epitestosterona, no 14º dpn, e de testosterona, no 21º dpn. A redução da expressão do AMH foi mais ampla e intensa no 14º dpn, final do período de proliferação, do que no período de maturação quando a secreção de AMH pelas células de Sertoli diminuiu naturalmente. O efeito da flutamida também inibiu a expressão do AMH nos filhotes dos grupos CTRL no 14º dpn mas esse efeito não foi observado no 21º dpn. Em outro estudo, filhotes expostos a flutamida (via leite materno) do nascimento ao 15º dpn não apresentaram alterações no imunoconteúdo do AMH porém, essa análise ocorreu somente no 25º dpn de forma que alterações podem ter ocorrido e posteriormente normalizadas assim como ocorreu no presente estudo (AUHAREK et al., 2010).

Alterações na secreção do AMH ou na expressão do AMHR2 resultam em alteração no número, no perfil enzimático e nos andrógenos sintetizados pelas células de Leydig (WU et al., 2005). Animais *knockout* para AMH apresentam um aumento no número e retardo na

diferenciação das células de Leydig que exibem um perfil enzimático imaturo com redução da síntese de testosterona e aumento de androstenediona e androstanediol no período puberal (WU et al., 2005). As alterações observadas no perfil enzimático destes animais incluem: redução da expressão da StAR (proteína reguladora aguda esteroidogênica) e aumento da expressão da 17 $\beta$ -HSD e da 5 $\alpha$ -redutase, na puberdade (WU et al., 2005). É possível que o AMH também regule a expressão da enzima 17 $\alpha$ -HSD promovendo a síntese de epitestosterona no período pré-púbere e de testosterona na puberdade e conseqüentemente, modulando o balanço entre a síntese de epitestosterona e de testosterona.

Com base nos dados obtidos até o momento sugere-se que a inibição do AMH secretado pelas células de Sertoli imaturas ocorra também pelo mecanismo de ação não clássico (CLEMENTE et al., 2018). O resultado observado neste estudo, sugere um efeito inibitório da epitestosterona (no 14<sup>º</sup> dpn) e da testosterona (no 21<sup>º</sup> dpn) sobre a expressão do AMH. Este efeito é dependente de iAR, e pode ser mediado pelo mecanismo clássico ou não clássico ou ainda por ambos. Além disso, a testosterona também inibiu a expressão do AMH no 14<sup>º</sup> dpn, porem ao que parece, este efeito é independente do iAR.

Uma vez que a concentração sérica de AMH é inversamente proporcional a de testosterona e sua secreção depende do estágio de desenvolvimento das células de Sertoli a concentração sérica de AMH é utilizada por pediatras e endocrinologistas como um marcador da maturação das células de Sertoli (EDELSZTEIN et al., 2016; TRBOVICH et al., 2001). Além disso, foi relatado uma relação inversa entre a concentração de AMH no fluido seminal e a motilidade dos espermatozoides, em humanos (SILVA; GIACOBINI, 2020). No entanto, a ação do AMH não se limita somente as gônadas de modo que a gama de efeitos biológicos é muito mais ampla do que se imaginava anteriormente. No tecido cerebral os efeitos do AMH incluem o aumento da atividade dos neurônios do GnRH influenciando a secreção do LH e, possivelmente, do FSH (SILVA; GIACOBINI, 2020). Machos e fêmeas *knockout* para o receptor do AMH apresentam redução no número de neurônios do GnRH e comprometimento da função reprodutora (SILVA; GIACOBINI, 2020). A contribuição do AMH produzido localmente e do AMH proveniente dos testículos na modulação da secreção do GnRH ainda é desconhecida mas as evidências sugerem que o AMH atua como um importante regulador neuroendócrino da reprodução atuando em diferentes níveis do eixo HHG (BARBOTIN et al., 2019; SILVA; GIACOBINI, 2020).

Os efeitos do AMH são mediados pelo AMHR2 que está presente em células de Sertoli de ratos imaturos e adultos. Sua expressão aumenta significativamente entre o 9º e o 14º dpn e então passa a diminuir progressivamente (BAARENDS et al., 1995). Recentemente, observou-se que o AMHR2 também é expresso pelos espermátocitos após o 15º dpn e pelas espermátides após o 21º dpn, variando sua expressão conforme o estágio do ciclo espermatogênico (OHYAMA et al., 2017).

A exposição ao EDS nos grupos controle no 14º dpn, resultou em redução da expressão do AMHR2 que não foi modificada pela reposição com testosterona ou epitestosterona sem a presença da flutamida.

Neste trabalho observamos um efeito da flutamida no grupo CTRL. Os animais expostos à flutamida no período pós-natal apresentaram uma redução da expressão do AMHR2 no 14º dpn, assim como o AMH, e no 21º dpn. Animais estéreis ou expostos à flutamida *in utero* apresentam uma redução do RNAm do AMHR2 (BENBRAHIM-TALLAA et al., 2007). O efeito da flutamida também foi observado nos animais castrados com reposição de testosterona e epitestosterona (14º dpn). Nestes animais a reposição hormonal em associação com a flutamida resultou em inibição do RNAm do AMHR2, indicando que estes andrógenos estão envolvidos na modulação da expressão do AMHR2 através do mecanismo de ação clássico ou não clássico, dependente de iAR.

No 14º dpn, a flutamida teve efeito sobre o imunoconteúdo do AMHR2 que aparece aumentado em todos os grupos. É possível que a redução da expressão do AMH, causada pela flutamida, resulte em *upregulation* do AMHR2. Entretanto, nos animais no 21º dpn este efeito não foi observado, possivelmente porque com a formação da BHT e o início da meiose a expressão de AMHR2 passa a variar conforme o estágio do ciclo espermatogênico (BAARENDS et al., 1995).

A BHT atua como uma barreira física constituída pelas junções entre células de Sertoli, uma barreira fisiológica que controla o fluxo de substâncias para o compartimento adluminal e uma barreira imunológica que impede a passagem de agentes nocivos do sistema imunológico para o compartimento adluminal (REBOURCET; O'SHAUGHNESSY; SMITH, 2019). Com a BHT as células de Sertoli fornecem as células meióticas e pós meióticas um ambiente controlado e protegido necessário para o progresso da espermatogênese (SHARPE et al., 2003).

A BHT é formada por de junções de oclusão, especializações ectoplasmáticas, junções comunicantes e desmossomos (CHENG; MRUK, 2012). As junções de oclusão são compostas

por proteínas transmembrana como moléculas de adesão juncional ocludinas e claudinas que são fundamentais para a manutenção da BHT (MOK; MRUK; CHENG, 2013). Dados recentes apontam que a ocludina é tão essencial para as junções de oclusão quanto a claudina (MCCABE et al., 2016). Já as junções comunicantes promovem a transdução de sinais célula-célula e estão envolvidas na modulação da função das junções de oclusão e especializações ectoplasmáticas (KOJIMA et al., 2007). Considerando que, a expressão e a localização destas proteínas na BHT são reguladas por andrógenos, o imunoconteúdo das proteínas ocludina e Cx43 foi analisado a fim de avaliar a influência da testosterona, da epitestosterona e do iAR na formação da BHT (KAITU'U-LINO et al., 2007; KOJIMA et al., 2007).

Na puberdade, as junções de oclusão são formadas concomitantemente com o aumento da secreção de FSH e de LH e, posteriormente, da testosterona (MCCABE et al., 2016). Em ratos, a imunomarcagem da ocludina torna-se mais intensa após o 14º dpn, com o início da formação da BHT (CYR et al., 1999). O tratamento com testosterona estimula a localização de ocludina nas áreas de contato entre células de Sertoli de ratos adultos, *in vitro* (CHOI; YOO; CHUNG, 2001). Em outro trabalho *in vitro*, também com células de Sertoli de ratos adultos, a exposição à testosterona não modificou o RNAm da ocludina mas alterou sua localização para as áreas de contato com outras células de Sertoli. Quando a flutamida foi associada à testosterona se observou um rompimento das junções de oclusão, mas a expressão do RNAm da ocludina também não foi modificada (KAITU'U-LINO et al., 2007). Neste trabalho, o tratamento hormonal associado ou não à flutamida não alterou o imunoconteúdo da ocludina nos testículos de ratos no 14º e 21º dpn.

A ocludina é essencial para a formação e manutenção da BHT entretanto, esta proteína está presente nos testículos desde o período fetal e sua expressão passa a aumentar entre o 5º e 7º dpn quando a concentração intratesticular de testosterona está reduzida indicando que, durante o desenvolvimento pós-natal, outros fatores podem estar envolvidos na sua modulação (CYR et al., 1999). Estudos recentes indicam que a ativina A inibe a formação de junções de oclusão entre células de Sertoli adjacentes (MERONI et al., 2019).

A espermatogênese envolve uma complexa conversa cruzada (*crosstalk*) entre as células de Sertoli e as células germinativas em processo de maturação (WU et al., 2020). As junções comunicantes desempenham papel fundamental nesta comunicação estabelecendo uma conexão direta entre o citoplasma de duas células (KUMAR; GILULA, 1996).

A reposição hormonal com testosterona e epitestosterona aumentou o imunocontéudo da Cx43 em relação aos animais castrados. O efeito do tratamento hormonal sobre o imunocontéudo da Cx43 ocorreu somente no 21º dpn quando a BHT já está formada. Este efeito não foi observado nos grupos tratados com flutamida sugerindo que a testosterona e a epitestosterona participam da modulação da Cx43 aumentando seu conteúdo proteico via iAR.

A ausência da Cx43 nas junções comunicantes entre células de Sertoli não é compensada por outras isoformas (POINTIS et al., 2011) e camundongos *knockout* para Cx43 nas células de Sertoli (SC-Cx43 KO) são inférteis apresentando importantes alterações no desenvolvimento testicular e na espermatogênese. Essas alterações resultam em células de Sertoli em um estágio intermediário de maturação com características tanto de células imaturas quanto de células diferenciadas e síndrome de células de Sertoli. A ausência de células germinativas na síndrome de células de Sertoli leva a azoospermia, ausência de espermatozoides no semem (WEIDER et al., 2011). Consequentemente, a infertilidade masculina ocasionada por alterações na espermatogênese pode estar relacionada à redução da expressão de Cx43 (GERBER et al., 2020). Além disso, estudos recentes mostram que as junções comunicantes exercem funções adicionais à sua função de canal controlando cascatas de sinalização envolvidas na migração, motilidade e adesão celular (GIEPMANS et al., 2001; KAMERITSCH; POGODA; POHL, 2012).

A expressão do iAR nas células de Sertoli é estimulada pelo FSH, hormônios da tireoide e andrógenos durante o período proliferativo destas células, contudo, sua atividade pode ser modulada por uma série de fatores (revisado por: Meroni et al., 2019).

Neste trabalho, o tratamento hormonal e a flutamida não alteraram a expressão do RNAm do iAR nas duas idades analisadas. Entretanto, no 21º dpn os animais castrados apresentaram uma redução no imunocontéudo do iAR que não foi alterada pela reposição com testosterona e epitestosterona. Nos animais tratados com testosterona e epitestosterona em associação com a flutamida, o imunocontéudo do iAR também se mostrou diminuído.

Em estudos anteriores do nosso grupo, o tratamento com epitestosterona (1mg/kg/dia) reduziu a expressão do RNAm do iAR em testículos de ratos tratados do 21º ao 35º dpn. Em outro estudo, foi observado que o tratamento com cetorelix também não produziu alteração do imunocontéudo do iAR com a castração e a reposição com testosterona em ratos no 14º dpn. Contudo, a administração de epitestosterona reduziu o imunocontéudo do iAR. Neste mesmo estudo foi observado que nos animais castrados que receberam reposição de

testosterona e epitestosterona a imunorreatividade ao iAR nas células de Sertoli de ratos foi reduzida (CAVALARI et al., 2018).

Este resultado foi semelhante ao do presente trabalho em relação ao conteúdo proteico do iAR, com exceção do efeito inibitório observado com a reposição da epitestosterona nos animais no 14º dpn. Contudo, neste trabalho os animais foram analisados também no 21º dpn, onde observamos a redução do imunoc conteúdo tanto nos animais castrados como nos castrados que receberam reposição dos hormônios.

A regulação da expressão do iAR depende de diversos fatores, como idade e tipo celular, e pode ocorrer a nível de transcrição e translação genica. A administração exógena de andrógenos inibe a expressão do RNAm do iAR, diminuindo a meia vida do RNAm, porém resulta em aumento dos níveis proteicos do receptor devido a inibição da degradação do iAR (LUETJENS; WEINBAUER, 2018). Ademais, podem ocorrer modificações pós translacionais na função, localização e estabilidade do receptor (MCEWAN; SMITH, 2018). Através da ligação ao iAR, a testosterona suprime a proliferação e estimula a maturação das células de Sertoli, *in vitro* (BUZZARD; WREFORD; MORRISON, 2003). Além disso, inibe a secreção do AMH e do FSH, principal estimulador da proliferação das células de Sertoli (AL-ATTAR et al., 1997; SUMMERVILLE; SCHWARTZ, 1981). Estudos com modelos animais geneticamente modificados, *knockout* para iAR em todos os tecidos (ARKO) ou especificamente na célula de Sertoli (SCARKO), revelam que a ausência de iAR interfere na maturação da célula de Sertoli, alterando e retardando a formação da BHT, modificando a expressão de genes relacionados à adesão celular e ao desenvolvimento do citoesqueleto da célula de Sertoli, impedindo o início e a progressão da meiose culminando em comprometimento da espermatogênese (O'SHAUGHNESSY; MONTEIRO; ABEL, 2012; WILLEMS et al., 2010).

Estudos recentes revelam que as células de Sertoli controlam não apenas a diferenciação sexual e a espermatogênese mas também atuam diretamente no desenvolvimento e na função testicular desde o período fetal até a vida adulta (REBOURCET et al., 2014). A capacidade de produção de espermatozoides no adulto depende do adequado desenvolvimento dos testículos e, especialmente, do número final de células de Sertoli, estabelecido na fase imatura (ORTH; HIGGINBOTHAM; SALISBURY, 1984). Ao contrário do que ocorre com as células de Leydig e as células germinativas que se regeneram a partir de células tronco, as células de Sertoli não exibem capacidade regenerativa de forma que, qualquer redução no seu número durante o desenvolvimento ou na vida adulta, ainda que com menor

impacto, afetará a composição testicular (REBOURCET et al., 2017; REBOURCET; O'SHAUGHNESSY; SMITH, 2019). O número de células germinativas está diretamente correlacionado ao número de células de Sertoli (ORTH, 1982; REBOURCET et al., 2017) pois com o estabelecimento da BHT as células germinativas que compõem um ciclo espermatogênico se associam a uma célula de Sertoli que lhes provem o suporte necessário ao seu desenvolvimento (LEBLOND; CLERMONT, 1952b). Uma vez que cada célula de Sertoli tem a habilidade de prover este suporte a um número limitado de células germinativas as gônadas precisam se manter imaturas até que as células de Sertoli proliferem, amadureçam, adquiram a capacidade de responder aos andrógenos e assim fornecer às células da linhagem espermatogênica um ambiente físico, estrutural e nutricional favorável para o início da meiose e progressão da espermatogênese (EDELSZTEIN; REY, 2019; ORTH, 1982). Nos últimos anos estudos realizados em modelos animais de ablação total ou parcial das células de Sertoli revelam que o número de células de Sertoli não determina apenas o número de células germinativas mas também o número de células de Leydig adultas e esta correlação é observada ao longo de toda a vida (REBOURCET; O'SHAUGHNESSY; SMITH, 2019). As células de Sertoli estimulam o início da diferenciação das células de Leydig fetais e adultas. Ao contrário das células de Leydig fetais as células de Leydig adultas continuam dependendo das células de Sertoli que estimulam sua proliferação, desenvolvimento e manutenção. Durante o período fetal e neonatal, as células de Sertoli estão envolvidas ainda na manutenção do fenótipo das células peritubulares e da estrutura dos túbulos seminíferos (REBOURCET et al., 2014).

É consenso que andrógenos são essenciais tanto para o desenvolvimento quanto para a manutenção da função reprodutora masculina. As células de Sertoli juntamente com as células de Leydig fetais e adultas promovem a síntese dos andrógenos indispensáveis ao desenvolvimento ao mesmo tempo em que inibem a maturação sexual. As evidências indicam que a epitestosterona é o principal andrógeno sintetizado no período neonatal/pré-pubere a partir da androstenediona e possivelmente de outros andrógenos epímeros, como o epiandrostanediol e a epiandrosterona.

Embora os dados acerca dos mecanismos de regulação e efeitos biológicos da epitestosterona sejam escassos é evidente que este hormônio desempenha um papel primordial no desenvolvimento. Ao que parece quando atua em tecidos extragonadais a epitestosterona exerce efeitos antagônicos aos da testosterona.

Por outro lado, os efeitos da epitestosterona nos testículos são muito similares aos da testosterona, ao menos no período perinatal quando iAR ainda não é expresso pelas células de Sertoli ou é expresso em pequena quantidade. Por muito tempo se considerou que, devido a ausência de iAR, as células de Sertoli eram insensíveis aos andrógenos neste período e que os seus efeitos seriam indiretos, mediados pelo iAR expresso em outras células testiculares, como as células peritubulares. Em estudos anteriores mostramos que tanto a testosterona quanto a epitestosterona promovem a rápida despolarização do potencial de membrana de células de Sertoli e o aumento da captação de cálcio em testículos de ratos imaturos com iAR bloqueado pela flutamida ou em neonatos, que ainda não expressão iAR nas células de Sertoli (DA ROSA et al., 2015; DE CASTRO et al., 2012). A partir destes dados, é possível concluir que as células de Sertoli não passam por um período de insensibilidade aos andrógenos, mas que no período perinatal os efeitos diretos dos andrógenos nas células de Sertoli são mediados pelo mecanismo de ação não clássico, independente de iAR (DA ROSA et al., 2015).

Inicialmente, se presumiu que os efeitos do mecanismo não clássico apenas complementavam os efeitos do mecanismo clássico (SILVA; LEITE; WASSERMANN, 2002). No entanto, os estudos apontam que pode ocorrer um *crosstalk* entre os dois mecanismos e, esta ação de início rápido, também pode culminar na regulação da transcrição gênica mediada pelo iAR (DENG et al., 2017a; SMITH; WALKER, 2014). Uma série de fatores sugerem esta interação ou até mesmo uma ação sinérgica dos dois mecanismos, como a elevada concentração de testosterona (> 70 nM) necessária para a espermatogênese (revisado em WALKER, 2009) e a translocação de iAR para o núcleo em decorrência da ativação de enzimas cinases pela ação não clássica da testosterona (DENG et al., 2017b).

Os diferentes mecanismos de ação que mediam os efeitos da testosterona e da epitestosterona, observados neste estudo, estão representados na Figura 21. O peso testicular foi reduzido pela testosterona e pela epitestosterona por um efeito não clássico, independente do iAR. Na fase imatura a testosterona e a epitestosterona reduziram o mRNA do AMH, mas por mecanismos distintos, enquanto o efeito da testosterona parece ser independente de iAR o da epitestosterona se mostrou dependente. No 14<sup>o</sup> dpn, ambos reduziram a expressão e aumentaram o conteúdo proteico do AMHR2 na presença da flutamida apontando para um efeito dependente do iAR. Na fase de maturação a testosterona e a epitestosterona aumentaram o conteúdo proteico da Cx43 e a testosterona inibiu a expressão do AMH por um mecanismo dependente do iAR.

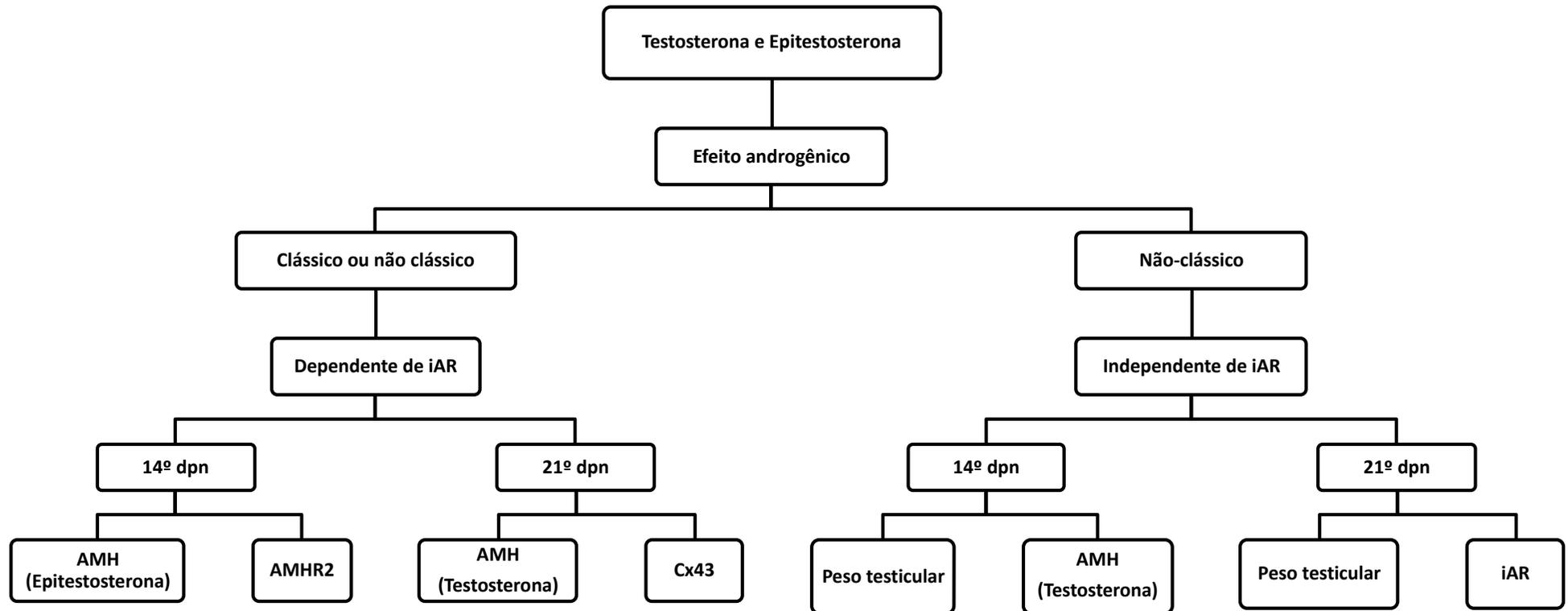


Figura 21 – Efeitos androgênicos da testosterona e da epitestosterona

Os efeitos androgênicos da testosterona e da epitestosterona são mediados pelo mecanismo de ação clássico ou não clássico, dependente do iAR, ou pelo mecanismo não clássico independente do iAR. Os efeitos clássicos ou não clássicos, dependente de iAR da testosterona e da epitestosterona incluem: a regulação do AMHR2 no 14º dpn e da Cx43 no 21º dpn. A expressão do AMH é modulada pela epitestosterona no 14º dpn e pela testosterona no 21º dpn. Os efeitos não clássicos, independentes de iAR da testosterona e da epitestosterona incluem: regulação do peso testicular no 14º e 21º dpn e do iAR no 21º dpn. A expressão do AMH é modulada pela testosterona no 14º dpn. iAR (receptor intracelular de andrógenos); AMH (Hormônio Anti-mülleriano); Cx43 (conexina-43) Fonte: Ilustração elaborada pela autora.

Apesar do avanço no conhecimento acerca das vias sinalização desencadeadas pela ação não clássica dos andrógenos o receptor de membrana envolvido neste mecanismo ainda não foi identificado embora as evidências apontem para um GPCR (LOSS et al., 2004). Nos últimos anos ao menos quatro proteínas foram apontadas como possíveis mAR: o TRPM8 (receptor de potencial transitório do tipo melastatina 8), o OXER1 (receptor oxoeicosanóide 1 de GPCR), a GPCR6A e o ZIP9 (revisado por THOMAS, 2019). Dentre eles o ZIP9 parece ser o candidato com maior potencial. O ZIP9 é um transportador de zinco que apresenta sítio de ligação com alta afinidade para a testosterona e baixa ou nenhuma afinidade aos demais esteroides. A interação da testosterona, em baixa concentração, com o ZIP9, e um GPCR, desencadeia o influxo de zinco, a ativação da cascata MAPK e do fator de transcrição CREB (BULLDAN et al., 2016). Entre os efeitos da testosterona mediados pelo ZIP9 está o aumento da expressão da claudina e na geração de junções oclusivas durante a formação da BHT em células da linhagem 93RS2, as quais são derivadas de uma linhagem de células de Sertoli pré-púberes que não expressam iAR (BULLDAN et al., 2016; THOMAS, 2018). O silenciamento do ZIP9 nestas células inibiu a ativação de Erk1/2 e CREB assim como a expressão de claudinas e a formação de junções de oclusão entre células adjacentes (BULLDAN et al., 2016). Recentemente observamos em nosso laboratório que o quelante de zinco TPEN inibe a despolarização e o aumento da resistência de membrana produzidos pela testosterona e pela nandrolona em células de Sertoli de ratos imaturos. Esta dependência de zinco sugere que o ZIP9 está envolvido no efeito não clássico da testosterona (SIMONETTI, 2017).

Nos testículos, os efeitos da testosterona e da epitestosterona mediados pelo mAR parecem estar relacionados ao desenvolvimento testicular. Os dois hormônios aumentam a concentração intracelular de cálcio que exerce diversos efeitos sobre o citoesqueleto das células de Sertoli, influenciando aspectos como mobilidade celular, adesão entre células de Sertoli e células germinativas, transcrição gênica, secreção de substâncias responsáveis pela comunicação entre as células testiculares e suporte nutricional das células germinativas (revisado em Loss et al. 2004).

No entanto, com a elevação da concentração intratesticular de testosterona e da expressão de iAR nas células de Sertoli a testosterona deixa de atuar exclusivamente no mAR e passa a atuar também no iAR promovendo efeitos adicionais aqueles mediados pelo mAR e relacionados à maturação sexual. Já os efeitos da epitestosterona, observados neste trabalho, parecem estar mais relacionados ao desenvolvimento do que à maturação. Nossos resultados,

especialmente o peso testicular, reforçam esta hipótese pois apesar do bloqueio do iAR pela flutamida, a administração exógena de testosterona parece ter acelerado a transição da fase proliferativa para a fase de maturação enquanto a epitestosterona promoveu o mesmo efeito porém com menor intensidade.

É notório que o AMH está envolvido na regulação do período de proliferação e na transição para a fase de maturação uma vez que controla a síntese e o metabolismo dos andrógenos. O AMH regula enzimas esteroideogênicas como a 17 $\beta$ -HSD de modo que é provável que regule também a 17 $\alpha$ -HSD controlando o balanço da ação da testosterona e da epitestosterona.

São necessários mais estudos para identificar os efeitos clássicos, e não clássicos, dos andrógenos mediados pelo iAR e, principalmente, não clássicos independentes de iAR.

A produção do gameta masculino, fundamental para a conservação da espécie, é um processo extremamente complexo que depende do desenvolvimento das gonadas durante o período perinatal (ORTH, 1984). As células de Sertoli são as primeiras células testiculares a se diferenciarem e orquestram todo o desenvolvimento do órgão, a maturação sexual e a espermatogênese. As células de Sertoli formam a base estrutural dos túbulos seminíferos, e ao longo dos estágios do ciclo espermatogênico se modificam adaptando-se às necessidades das células da linhagem espermatogênica (PARVINEN, 1982). O arranjo da citoarquitetura entre as células de Sertoli e as células germinativas é um dos mais complexos exemplos de interação célula-célula na biologia (XU et al., 2007). Tal a importância das células de Sertoli na função reprodutora que elas são consideradas uma das células mais complexas e dinâmicas conhecidas na biologia (FRANÇA et al., 2016).

## 8 CONCLUSÃO

Os resultados deste trabalho sugerem que a epitestosterona exerce efeitos antiandrogênicos no crescimento corporal, no índice anogenital e no epidídimo.

Nos testículos, a testosterona e a epitestosterona promoveram efeitos similares mediados pelos mecanismos clássico ou não clássico:

O peso testicular, a expressão do AMH, e o conteúdo proteico do iAR parecem ser modulados pelo mecanismo de ação não clássico independente do iAR.

A expressão do AMHR2 e o conteúdo proteico do AMHR2 e da Cx43 se mostraram dependentes de iAR e podem ser regulados pelo mecanismo de ação clássico ou não clássico.

Esses resultados corroboram com a hipótese de que durante o desenvolvimento, tanto a epitestosterona quanto a testosterona promovem o desenvolvimento testicular. Porém, nossos resultados sugerem que estes efeitos, embora similares, podem ser mediados por mecanismos distintos.

O balanço da ação da testosterona e da epitestosterona é de suma importância para o desenvolvimento e a maturação testicular e o AMH parece ser um importante modulador deste balanço e da transição da fase de proliferação para a fase de maturação.

## PERPESCTIVAS

Os andrógenos também têm influência significativa na formação, morfologia e função das estruturas cerebrais. Os andrógenos produzidos nos testículos são transportados até o cérebro na circulação sanguínea onde atuam de forma direta ou indireta através de sua conversão a estradiol. As estruturas cerebrais sensíveis aos andrógenos incluem hipotálamo, hipocampo, amígdala, cerebelo e córtex frontal (revisado por (FILOVÁ et al., 2013)). Durante este estudo o hipotálamo, o hipocampo e o córtex frontal dos animais foram coletadas e estão armazenados para análise posterior.

Durante a redação do referencial teórico para a tese foi realizado um apanhado dos principais eventos, concentrações hormonais, expressão receptores, etc... durante cada fase do desenvolvimento. Para a tese priorizamos as informações referentes ao período de imaturidade sexual e este material será publicado posteriormente como um artigo de revisão.

## REFERÊNCIAS

AA, H. et al. Postnatal Changes in the Structure of Rat Testis. **Postnatal Changes in the Structure of Rat Testis J Embryol Stem Cell Res**, 2019.

ABD EL-MESEEH, N. A. et al. Changes in rat testis morphology and androgen receptor expression around the age of puberty. **Annals of anatomy = Anatomischer Anzeiger : official organ of the Anatomische Gesellschaft**, v. 205, p. 37–44, May 2016.

ABREU, A. P.; KAISER, U. B. Pubertal development and regulation. **The Lancet Diabetes & Endocrinology**, v. 4, n. 3, p. 254–264, Mar. 2016.

AL-ATTAR, L. et al. Hormonal and cellular regulation of Sertoli cell anti-Müllerian hormone production in the postnatal mouse. **Journal of Clinical Investigation**, v. 100, n. 6, p. 1335–1343, 15 Sep. 1997.

ARAMBEPOLA, N.; BUNICK, D.; COOKE, P. Thyroid hormone effects on androgen receptor messenger RNA expression in rat Sertoli and peritubular cells. **Journal of Endocrinology**, v. 156, n. 1, p. 43–50, 1 Jan. 1998a.

ARAMBEPOLA, N. K.; BUNICK, D.; COOKE, P. S. Thyroid hormone and follicle-stimulating hormone regulate Müllerian-inhibiting substance messenger ribonucleic acid expression in cultured neonatal rat Sertoli cells. **Endocrinology**, v. 139, n. 11, p. 4489–95, Nov. 1998b.

ARCHAMBEAULT, D. R.; YAO, H. H.-C. H.-C. H.-C. Activin A, a product of fetal Leydig cells, is a unique paracrine regulator of Sertoli cell proliferation and fetal testis cord expansion. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 107, n. 23, p. 10526–10531, 8 Jun. 2010.

ARIYARATNE, H. B. S. Changes in the Testis Interstitium of Sprague Dawley Rats from Birth to Sexual Maturity. **Biology of Reproduction**, v. 62, n. 3, p. 680–690, 1 Mar. 2000.

ATANASSOVA, N.; KOEVA, Y. Hydroxysteroid Dehydrogenases – Biological Role and Clinical Importance – Review. In: CANUTO, R. A. (Ed.). **Dehydrogenases: Biochemistry, Genetics and Molecular Biology**. [s.l.] InTech, 2012. p. 115–67.

ATANASSOVA, N. N. et al. Evidence that androgens and oestrogens, as well as follicle-stimulating hormone, can alter Sertoli cell number in the neonatal rat. **The Journal of endocrinology**, v. 184, n. 1, p. 107–17, 1 Jan. 2005.

AUHAREK, S. A. et al. Prenatal plus postnatal exposure to Di(n-Butyl) phthalate and/or flutamide markedly reduces final sertoli cell number in the rat. **Endocrinology**, v. 151, n. 6, p. 2868–2875, 2010.

BAARENDS, W. M. et al. Anti-müllerian hormone and anti-müllerian hormone type II receptor messenger ribonucleic acid expression during postnatal testis development and in the adult testis of the rat. **Endocrinology**, v. 136, n. 12, p. 5614–5622, 1 Dec. 1995.

BAKER, P.; O'SHAUGHNESSY, P. Role of gonadotrophins in regulating numbers of Leydig and Sertoli cells during fetal and postnatal development in mice. **Reproduction**, v. 122, n. 2, p. 227–234, 1 Aug. 2001.

BARAKAT, B. et al. Inhibin, activin, follistatin and FSH serum levels and testicular production are highly modulated during the first spermatogenic wave in mice. **Reproduction**, v. 136, n. 3, p. 345–359, 2008.

BARBOTIN, A.-L. et al. Emerging Roles of Anti-Müllerian Hormone in Hypothalamic-Pituitary Function. **Neuroendocrinology**, v. 109, n. 3, p. 218–229, 2019.

BARKHA, S. **The role of tumor necrosis factor-alpha in the adult Leydig cell apoptosis upon ethane dimethane sulfonate (EDS) administration**. [s.l.] Texas Woman's University, 2015.

BATIAS, C. et al. Connexin43 gene expression and regulation in the rodent seminiferous epithelium. **Journal of Histochemistry and Cytochemistry**, v. 48, n. 6, p. 793–805, 2000.

BELLEMARE, V. et al. Characterization of 17alpha-hydroxysteroid dehydrogenase activity (17alpha-HSD) and its involvement in the biosynthesis of epitestosterone. **BMC biochemistry**, v. 6, p. 12, Jan. 2005.

BENBRAHIM-TALLAA, L. et al. Alterations of Sertoli cell activity in the long-term testicular germ cell death process induced by fetal androgen disruption. **Journal of Endocrinology**, v. 196, n. 1, p. 21–31, 10 Oct. 2007.

BENNETT, N. C. et al. Molecular cell biology of androgen receptor signalling. **The international journal of biochemistry & cell biology**, v. 42, n. 6, p. 813–27, Jun. 2010.

BERRIDGE, M. J.; BOOTMAN, M. D.; LIPP, P. Calcium--a life and death signal. **Nature**, v. 395, n. 6703, p. 645–8, 15 Oct. 1998.

BICÍKOVÁ, M.; HAMPL, R.; STÁRKA, L. Epitestosterone--a potent competitive inhibitor of C21-steroid side chain cleavage in the testis. **The Journal of steroid biochemistry and molecular biology**, v. 43, n. 7, p. 721–4, Dec. 1992.

BLANCHARD, M. G.; JOSSO, N. Source of the anti-Müllerian hormone synthesized by the fetal testis: Müllerian-inhibiting activity of fetal bovine Sertoli cells in tissue culture. **Pediatric research**, v. 8, n. 12, p. 968–71, Dec. 1974.

BORTOLUSSI, M. et al. Sertoli and Leydig cell numbers and gonadotropin receptors in rat testis from birth to puberty. **Cell and Tissue Research**, v. 260, n. 1, p. 185–191, Apr. 1990.

BOULOGNE, B. et al. Apoptosis and mitosis in gonocytes of the rat testis during foetal and neonatal development. **International journal of andrology**, v. 22, n. 6, p. 356–65, Dec. 1999.

BOURGUIGNON, J. P. et al. Maturation of the Hypothalamic Control of Pulsatile Gonadotropin-Releasing Hormone Secretion at Onset of Puberty. I. Increased Activation of N - Methyl-DAspartate Receptors\*. **Endocrinology**, v. 127, n. 2, p. 873–881, Aug. 1990.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical biochemistry**, v. 72, p. 248–54, 7 May 1976.

BRANN, D. W.; HENDRY, L. B.; MAHESH, V. B. Emerging diversities in the mechanism of action of steroid hormones. **Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 52, n. 2, p. 113–133, 1995.

BRASIL. Lei 11.794 de 08 de outubro de 2008. Regulamenta o inciso VII do § 1 do art. 225 da Constituição Federal, estabelecendo procedimentos para o uso científico de animais; revoga a Lei no 6.638, de 8 de maio de 1979; e dá outras providências. . Oct. 2008.

BRASIL. Resolução Normativa n.13 de 20 de setembro de 2013. Baixa as Diretrizes da Prática de Eutanásia do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal - CONCEA. . 26 Sep. 2013 a, p. 5–12.

BRASIL. Resolução Normativa n. 12 de 20 de setembro de 2013. Baixa a diretriz brasileira para o cuidado e a utilização de animais para fins científicos e didáticos. . 26 Sep. 2013 b, p. 52–59.

BRASIL. Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais em Atividades de Ensino ou de Pesquisa Científica - DBCA. . 2 Feb. 2016.

BRAVO-MORENO, J. F. et al. Expression of connexin43 in mouse Leydig, Sertoli, and germinal cells at different stages of postnatal development. **Anatomical Record**, v. 264, n. 1, p. 13–24, 2001.

BREMNER, W. J. et al. Immunohistochemical localization of androgen receptors in the rat testis: evidence for stage-dependent expression and regulation by androgens. **Endocrinology**, v. 135, n. 3, p. 1227–1234, Sep. 1994.

BROGDEN, R. N.; CHRISP, P. Flutamide: A Review of its Pharmacodynamic and Pharmacokinetic Properties, and Therapeutic Use in Advanced Prostatic Cancer. **Drugs & Aging**, v. 1, n. 2, p. 104–115, Mar. 1991.

BROGDEN, R. N.; CLISSOLD, S. P. Flutamide: A Preliminary Review of its Pharmacodynamic and Pharmacokinetic Properties, and Therapeutic Efficacy; in Advanced Prostatic Cancer. **Drugs**, v. 38, n. 2, p. 185–203, 1989.

BRUGH, V. M.; MATSCHKE, H. M.; LIPSHULTZ, L. I. Male factor infertility. **Endocrinology and Metabolism Clinics of North America**, v. 32, n. 3, p. 689–707, 9 Sep. 2003.

BULLDAN, A. et al. Non-classical testosterone signaling mediated through ZIP9 stimulates claudin expression and tight junction formation in Sertoli cells. **Cellular Signalling**, v. 28, n. 8, p. 1075–1085, 2016.

BULLDAN, A. et al. Testosterone/bicalutamide antagonism at the predicted extracellular androgen binding site of ZIP9. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research**, v. 1864, n. 12, p. 2402–2414, 2017.

BUZZARD, J. J. et al. Changes in circulating and testicular levels of inhibin A and B and activin A during postnatal development in the rat. **Endocrinology**, v. 145, n. 7, p. 3532–3541, 2004.

BUZZARD, J. J.; WREFORD, N. G.; MORRISON, J. R. Thyroid Hormone, Retinoic Acid, and Testosterone Suppress Proliferation and Induce Markers of Differentiation in Cultured Rat Sertoli Cells. **Endocrinology**, v. 144, n. 9, p. 3722–3731, 1 Sep. 2003.

C. DESJARDINS. ENDOCRINE REGULATION OF REPRODUCTIVE DEVELOPMENT AND FUNCTION IN THE MALE. **Journal of Animal Science**, v. 47, p. 56–79, 1978.

CAROPPO, E. Male hypothalamic–pituitary–gonadal axis. In: LIPSHULTZ, L. I.; HOWARDS, S. S.; NIEDERBERGER, C. S. (Eds.). . **Infertility in the Male**. Cambridge: Cambridge University Press, 2019. p. 14–28.

CARR, F. E.; CHIN, W. W. Absence of Detectable Chorionic Gonadotropin Subunit Messenger Ribonucleic Acids in the Rat Placenta throughout Gestation\*. **Endocrinology**, v. 116, n. 3, p. 1151–1157, Mar. 1985.

CAVALARI, F. C. et al. Epitestosterone- and testosterone-replacement in immature castrated rats changes main testicular developmental characteristics. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 461, p. 112–121, Feb. 2018.

CHAKRABORTY, P. et al. Androgen-dependent sertoli cell tight junction remodeling is mediated by multiple tight junction components. **Molecular endocrinology (Baltimore, Md.)**, v. 28, n. 7, p. 1055–72, 13 Jul. 2014.

CHAMINDRANI MENDIS-HANDAGAMA, S. M. L.; SIRIL ARIYARATNE, H. B. Leydig cells, thyroid hormones and steroidogenesis. **Indian Journal of Experimental Biology**, v. 43, n. 11, p. 939–962, 2005.

CHAMINDRANI MENDIS-HANDAGAMA, S. M. L.; SIRIL ARIYARATNE, H. B. Effects of hypothyroidism on anti-mullerian hormone expression in the prepubertal rat testis. **Histology and Histopathology**, v. 23, n. 2, p. 151–156, 2008.

CHEN, Y. D. I.; SHAW, M. J.; PAYNE, A. H. Steroid and fsh action on lh receptors and lh-sensitive testicular responsiveness during sexual maturation of the rat. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 8, n. 4, p. 291–299, 1977.

CHENG, C. Y.; MRUK, D. D. The blood-testis barrier and its implications for male contraception. **Pharmacological reviews**, v. 64, n. 1, p. 16–64, Jan. 2012.

CHENG, J.; WATKINS, S. C.; WALKER, W. H. Testosterone activates mitogen-activated protein kinase via Src kinase and the epidermal growth factor receptor in sertoli cells. **Endocrinology**, v. 148, n. 5, p. 2066–2074, 2007.

CHOI, M. H.; YOO, Y. S.; CHUNG, B. C. Biochemical roles of testosterone and epitestosterone to 5 alpha-reductase as indicators of male-pattern baldness. **The Journal of investigative dermatology**, v. 116, n. 1, p. 57–61, Jan. 2001.

CHOJNACKA, K. et al. Hydroxyflutamide affects connexin 43 via the activation of PI3K/Akt-dependent pathway but has no effect on the crosstalk between PI3K/Akt and ERK1/2 pathways at the Raf-1 kinase level in primary rat Sertoli cells. **Toxicology in Vitro**, v. 31, p. 146–157, Mar. 2016.

CLARK, LELAND C., J.; KOCHAKIAN, C. D. The in vitro metabolism of testosterone to 4-androstenedione-3,17 cis-testosterone and other steroids by rabbit liver slices. **J. Biol. Chem.**, v. 170, n. 1, p. 23–33, 1 Sep. 1947.

CLARKSON, J.; HERBISON, A. E. Hypothalamic control of the male neonatal testosterone surge. **Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences**, v. 371, n. 1688, p. 20150115-, 19 Feb. 2016.

CLEMENTE, N. et al. Androgens downregulate anti-Müllerian hormone promoter activity in the Sertoli cell through the androgen receptor and intact SF1 sites. v. 0, n. November 2016, p. 15–19, 2018.

CLERMONT, Y.; PEREY, B. Quantitative study of the cell population of the seminiferous tubules in immature rats. **American Journal of Anatomy**, v. 100, n. 2, p. 241–267, Mar. 1957.

CRÉPIEUX, P. et al. The ERK-dependent signalling is stage-specifically modulated by FSH, during primary Sertoli cell maturation. **Oncogene**, v. 20, n. 34, p. 4696–709, 2 Aug. 2001.

CUPP, A. S.; SKINNER, M. K. Embryonic Sertoli Cell Differentiation. In: **Sertoli Cell Biology**. San Diego: Academic Press, 2005. p. 43–70.

CYR, D. G. et al. Cellular immunolocalization of occludin during embryonic and postnatal development of the mouse testis and epididymis. **Endocrinology**, v. 140, n. 8, p. 3815–3825, 1999.

DA ROSA, L. A. et al. Non-classical effects of androgens on testes from neonatal rats. **Steroids**, v. 93, p. 32–38, Jan. 2015.

DAVEY, R. A.; GROSSMANN, M. Androgen Receptor Structure, Function and Biology: From Bench to Bedside. **The Clinical biochemist. Reviews**, v. 37, n. 1, p. 3–15, Feb. 2016.

DE CASTRO, A. et al. Epitestosterone and Testosterone have Similar Nonclassical Actions on Membrane of Sertoli Cells in Whole Seminiferous Tubules. **Hormone and Metabolic Research**, v. 45, n. 01, p. 15–21, 6 Sep. 2012.

DECROUY, X. et al. Functional characterization of Cx43 based gap junctions during spermatogenesis. **Journal of Cellular Physiology**, v. 200, n. 1, p. 146–154, 2004.

DENG, Q. et al. Non-Genomic Action of Androgens is Mediated by Rapid Phosphorylation and Regulation of Androgen Receptor Trafficking. **Cellular Physiology and Biochemistry**, v. 43, n. 1, p. 223–236, 2017a.

DENG, Q. et al. Androgen Receptor Localizes to Plasma Membrane by Binding to Caveolin-1 in Mouse Sertoli Cells. **International Journal of Endocrinology**, v. 2017, p. 1–8, 31 May 2017b.

DONG, L. et al. Gene expression during development of fetal and adult Leydig cells. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1120, n. C, p. 16–35, 2007.

DONOVAN, P. J.; DEMIGUEL, M. P. Gonocyte Development and Differentiation. In: **Sertoli Cell Biology**. San Diego: Academic Press, 2005. p. 417–435.

DORFMAN, R. I. Anti-Androgens. In: **Steroidal Activity in Experimental Animals and Man**. [s.l.] Elsevier, 1965. p. 77–93.

DORFMAN, R. I. BIOLOGICAL ACTIVITY OF ANTIANDROGENS. **British Journal of Dermatology**, v. 82, n. s6, p. 3–3, Jun. 1970.

DORFMAN, R. I.; SHIPLEY, R. A. **Androgens**. New York, NY: Wiley, 1956.

DREWS, U.; SULAK, O.; OPPITZ, M. Immunohistochemical localisation of androgen receptor during sex-specific morphogenesis in the fetal mouse. **Histochemistry and Cell Biology**, v. 116, n. 5, p. 427–439, 2001.

DUFAU, M. L. et al. Hormonal regulation of androgen production by the Leydig cell. **Journal of Steroid Biochemistry**, v. 20, n. 1, p. 161–173, 1984.

DUPONT, É. et al. Ontogeny of 3 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase/ $\Delta$  5 -  $\Delta$  4 isomerase (3 $\beta$ -HSD) in rat testis as studied by immunocytochemistry. **Anatomy and Embryology**, v. 187, n. 6, p. 583–589, 1993.

DYM, M.; FAWCETT, D. W. The blood-testis barrier in the rat and the physiological compartmentation of the seminiferous epithelium. **Biology of reproduction**, v. 3, n. 3, p. 308–326, 1970.

EDELSZTEIN, N. Y. et al. Anti-Müllerian hormone as a marker of steroid and gonadotropin action in the testis of children and adolescents with disorders of the gonadal axis. **International Journal of Pediatric Endocrinology**, v. 2016, n. 1, p. 20, 28 Dec. 2016.

EDELSZTEIN, N. Y.; REY, R. A. Importance of the androgen receptor signalling in gene transactivation and transrepression for pubertal maturation of the testis. n. July, p. 1–20, 2019.

EL-GEHANI, F. et al. Gonadotropin-Independent Regulation of Steroidogenesis in the Fetal Rat Testis. **Biology of Reproduction**, v. 58, n. 1, p. 116–123, 1998.

ESCOTT, G.; DA ROSA, L.; LOSS, E. Mechanisms of Hormonal Regulation of Sertoli Cell Development and Proliferation: A Key Process for Spermatogenesis. **Current Molecular Pharmacology**, v. 7, n. 2, p. 96–108, 25 Feb. 2015.

ESCOTT, G. M.; DA ROSA, L. A.; LOSS, E. DA S. Mechanisms of Hormonal Regulation of Sertoli Cell Development and Proliferation: A Key Process for Spermatogenesis. **Current Molecular Pharmacology**, 2014.

FILOVÁ, B. et al. The effect of testosterone on the formation of brain structures. **Cells, tissues, organs**, v. 197, n. 3, p. 169–77, 8 Jan. 2013.

FIX, C. et al. Testosterone activates mitogen-activated protein kinase and the cAMP response element binding protein transcription factor in Sertoli cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 101, n. 30, p. 10919–24, 27 Jul. 2004.

FORADORI, C. D.; WEISER, M. J.; HANDA, R. J. Non-genomic actions of androgens. **Frontiers in Neuroendocrinology**, v. 29, n. 2, p. 169–181, May 2008.

FRANÇA, L. R. et al. The Sertoli cell: One hundred fifty years of beauty and plasticity. **Andrology**, v. 4, n. 2, p. 189–212, 2016.

FREE, M.; JAFFE, R.; CHENG, H. Effect of Anesthetics on Testosterone Production in Rats. **Journal of Andrology**, v. 1, n. 4, p. 182–196, 8 Jul. 1980.

FRÖJDMAN, K. et al. Presence of anti-Müllerian hormone correlates with absence of laminin  $\alpha$ 5 chain in differentiating rat testis and ovary. **Histochemistry and Cell Biology**, v. 111, n. 5, p. 367–373, 20 May 1999.

GALLAVAN, R. H. et al. Interpreting the toxicologic significance of alterations in anogenital distance: potential for confounding effects of progeny body weights. **Reproductive Toxicology**, v. 13, n. 5, p. 383–390, Sep. 1999.

GE, R.-S.; HARDY, M. P. Variation in the End Products of Androgen Biosynthesis and Metabolism during Postnatal Differentiation of Rat Leydig Cells\*. **Endocrinology**, v. 139, n. 9, p. 3787–3795, 1 Sep. 1998.

GE, R.; HARDY, M. P. Regulation of Leydig Cells During Pubertal Development. In: PAYNE, A. H.; HARDY, M. P. (Eds.). **The Leydig Cell in Health and Disease**. Contemporary Endocrinology. Totowa, NJ: Humana Press, 2007.

GENTRY, R. T.; WADE, G. N. Androgenic control of food intake and body weight in male rats. **Journal of Comparative and Physiological Psychology**, v. 90, n. 1, p. 18–25, 1976.

GERBER, J. et al. Establishment and functional characterization of a murine primary Sertoli cell line deficient of connexin43. **Cell and Tissue Research**, v. 381, n. 2, p. 309–326, 2020.

GIEPMANS, B. N. G. et al. Gap junction protein connexin-43 interacts directly with microtubules. **Current Biology**, v. 11, n. 17, p. 1364–1368, 2001.

GILLERON, J. et al. Connexin 43 a potential regulator of cell proliferation and apoptosis within the seminiferous epithelium. **International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, v. 41, n. 6, p. 1381–1390, 2009.

GILULA, N. B.; FAWCETT, D. W.; AOKI, A. The Sertoli cell occluding junctions and gap junctions in mature and developing mammalian testis. **Developmental Biology**, v. 50, n. 1, p. 142–168, May 1976.

GOODENOUGH, D. A.; GOLIGER, J. A.; PAUL, D. L. **Connexins, connexons, and intercellular communication** *Annual Review of Biochemistry*, Jun. 1996. Disponível em: <<http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev.bi.65.070196.002355>>

GOULD, E. M. The effect of ketamine/xylazine and carbon dioxide on plasma luteinizing hormone releasing hormone and testosterone concentrations in the male Norway rat. **Laboratory animals**, v. 42, n. 4, p. 483–8, 1 Oct. 2008.

GRINO, P. B.; GRIFFIN, J. E.; WILSON, J. D. Testosterone at high concentrations interacts with the human androgen receptor similarly to dihydrotestosterone. **Endocrinology**, v. 126, n. 2, p. 1165–1172, 1990.

GRINSPON, R. P.; URRUTIA, M. The importance of follicle-stimulating hormone in the prepubertal and pubertal testis. **Current Opinion in Endocrine and Metabolic Research**, v. 14, p. 137–144, 2020.

GRISWOLD, M. D. The central role of Sertoli cells in spermatogenesis. **Seminars in Cell & Developmental Biology**, v. 9, n. 4, p. 411–416, Aug. 1998.

GRISWOLD, M. D.; MCLEAN, D. The Sertoli Cell. In: NEILL, J. D. et al. (Eds.). **Knobil and Neill's Physiology of Reproduction**. 3. ed. St Louis: Academic Press, 2006. p. 949–975.

GRISWOLD, S. L.; BEHRINGER, R. R. Fetal Leydig cell origin and development. **Sexual development: genetics, molecular biology, evolution, endocrinology, embryology, and pathology of sex determination and differentiation**, v. 3, n. 1, p. 1–15, Jan. 2009.

HABERT, R.; PICON, R. Testosterone, dihydrotestosterone and estradiol-17 $\beta$  levels in maternal and fetal plasma and in fetal testes in the rat. **Journal of Steroid Biochemistry**, v. 21, n. 2, p. 193–198, Aug. 1984.

HALES, D. B. Interleukin-1 inhibits Leydig cell steroidogenesis primarily by decreasing 17 alpha-hydroxylase/C17-20 lyase cytochrome P450 expression. **Endocrinology**, v. 131, n. 5, p. 2165–2172, Nov. 1992.

HAMZEH, M.; ROBAIRE, B. Androgens activate mitogen-activated protein kinase via epidermal growth factor receptor/insulin-like growth factor 1 receptor in the mouse PC-1 cell line. **Journal of Endocrinology**, v. 209, n. 1, p. 55–64, 2011.

HARDY, M. P.; ZIRKIN, B. R.; EWING, L. L. Kinetic studies on the development of the adult population of leydig cells in testes of the pubertal rat. **Endocrinology**, v. 124, n. 2, p. 762–770, 1989.

HEJMEJ, A.; BILINSKA, B. The effects of flutamide on cell-cell junctions in the testis, epididymis, and prostate. **Reproductive Toxicology**, v. 81, n. March, p. 1–16, 1 Oct. 2018.

HERNANDEZ, A. **Thyroid Hormone Role and Economy in the Developing Testis**. 1. ed. [s.l.] Elsevier Inc., 2018. v. 106

HESS, R. A.; DE FRANCA, L. R. Spermatogenesis and cycle of the seminiferous epithelium. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 636, p. 1–15, 2008.

HIROBE, S. et al. Mullerian inhibiting substance messenger ribonucleic acid expression

in granulosa and Sertoli cells coincides with their mitotic activity. **Endocrinology**, v. 131, n. 2, p. 854–862, Aug. 1992.

HSUEH, A. J. W.; DAFAU, M. L.; CATT, K. J. Regulation of luteinizing hormone receptors in testicular interstitial cells by gonadotropin. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 72, n. 3, p. 1145–1152, Oct. 1976.

HUHTANIEMI, I. Molecular aspects of the ontogeny of the pituitary-gonadal axis. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 7, n. 5, p. 1025–1035, 1995.

HUHTANIEMI, I.; PELLINIEMI, L. J. Fetal Leydig Cells: Cellular Origin, Morphology, Life Span, and Special Functional Features. **Experimental Biology and Medicine**, v. 201, n. 2, p. 125–140, 1 Nov. 1992.

HUHTANIEMI, I. T. et al. Acquisition of Regulatory Mechanisms for Gonadotropin Receptors and Steroidogenesis in the Maturing Rat Testis\*. **Endocrinology**, v. 111, n. 5, p. 1711–1720, Nov. 1982.

ILACQUA, A.; FRANCOMANO, D.; AVERSA, A. The Physiology of the Testis. In: **Journal of the American Medical Association**. [s.l: s.n.]. v. 116p. 1–38.

ILAGAN, R. et al. Imaging androgen receptor function during flutamide treatment in the LAPC9 xenograft model. **Molecular Cancer Therapeutics**, v. 4, n. 11, p. 1662–1669, 2005.

INOUE, M.; BABA, T.; MOROHASHI, K.-I. Recent progress in understanding the mechanisms of Leydig cell differentiation. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 468, n. 4, p. 39–46, Jun. 2018.

JACKSON, C. M.; JACKSON, H. Comparative protective actions of gonadotrophins and testosterone against the antispermatogenic action of ethane dimethanesulphonate. **Journal of reproduction and fertility**, v. 71, n. 2, p. 393–401, Jul. 1984.

JACKSON, C. M.; MORRIS, I. D. Gonadotrophin Levels in Male Rats Following Impairment of Leydig Cell Function by Ethylene Dimethanesulphonate. **Andrologia**, v. 9, n. 1, p. 29–35, 24 Apr. 1977.

JACOBUS, A. P.; LOSS, E. S.; WASSERMANN, G. F. Pertussis toxin nullifies the depolarization of the membrane potential and the stimulation of the rapid phase of Ca entry through L-type calcium channels that are produced by follicle stimulating hormone in 10- to 12-day-old rat Sertoli cells. **Front Physiol.**, v. 1, p. 138, 21 Jan. 2010.

JANSSON, J. O.; EDEN, S.; ISAKSSON, O. Sites of action of testosterone and estradiol on longitudinal bone growth. **American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism**, v. 7, n. 2, 1983.

JÉGOU, B.; ROLLAND, A. D. **Sertoli Cell**. Second Edi ed. [s.l.] Elsevier, 2018. v. 1

JOSSO, N. et al. The role of anti-Müllerian hormone in gonadal development. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 145, n. 1–2, p. 3–7, Oct. 1998.

JOSSO, N.; DI CLEMENTE, N.; GOUÉDARD, L. Anti-Müllerian hormone and its receptors. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 179, n. 1–2, p. 25–32, 20 Jun. 2001.

JUNGWIRTH, A. et al. European Association of Urology guidelines on Male Infertility: the 2012 update. **European urology**, v. 62, n. 2, p. 324–32, Aug. 2012.

KAITU'U-LINO, T. J. et al. Claudin-11 expression and localisation is regulated by

androgens in rat Sertoli cells in vitro. **Reproduction**, v. 133, n. 6, p. 1169–1179, 1 Jun. 2007.

KAMERITSCH, P.; POGODA, K.; POHL, U. Channel-independent influence of connexin 43 on cell migration. **Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes**, v. 1818, n. 8, p. 1993–2001, 2012.

KERR, J. B.; RISBRIDGER, G. P.; KNELL, C. M. Stimulation of interstitial cell growth after selective destruction of foetal Leydig cells in the testis of postnatal rats. **Cell and Tissue Research**, v. 252, n. 1, Apr. 1988.

KERR, J.; BARTLETT, J. M. S.; DONACHIE, K. Acute response of testicular interstitial tissue in rats to the cytotoxic drug ethane dimethanesulphonate - An ultrastructural and hormonal assay study. **Cell and Tissue Research**, v. 243, n. 2, p. 405–414, 1986.

KETELSLEGERS, J.-M. M. et al. Developmental changes in testicular gonadotropin receptors: plasma gonadotropins and plasma testosterone in the rat. **Endocrinology**, v. 103, n. 1, p. 212–22, 1 Jul. 1978.

KICMAN, A. T. Pharmacology of anabolic steroids. **British Journal of Pharmacology**, v. 154, n. 3, p. 502–521, 2008.

KIM, J. M.; LUO, L.; ZIRKIN, B. R. Caspase-3 activation is required for Leydig cell apoptosis induced by ethane dimethanesulfonate. **Endocrinology**, v. 141, n. 5, p. 1846–53, 7 May 2000.

KOJIMA, T. et al. Connexins Induce and Maintain Tight Junctions in Epithelial Cells. **Journal of Membrane Biology**, v. 217, n. 1–3, p. 13–19, 14 Nov. 2007.

KOLASA-WOŁOSIUK, A. et al. Connexin 43 expression in the testes during postnatal development of finasteride-treated male rat offspring. **Archives of Medical Science**, v. 14, n. 6, p. 1471–1479, 2018.

KUMAR, N. M.; GILULA, N. B. The Gap Junction Communication Channel. **Cell**, v. 84, n. 3, p. 381–388, Feb. 1996.

KURODA, T. et al. Mullerian inhibiting substance ontogeny and its modulation by follicle-stimulating hormone in the rat testes. **Endocrinology**, v. 127, n. 4, p. 1825–32, Oct. 1990.

LEBLOND, C. P.; CLERMONT, Y. Spermiogenesis of rat, mouse, hamster and guinea pig as revealed by the ?periodic acid-fuchsin sulfurous acid? technique. **American Journal of Anatomy**, v. 90, n. 2, p. 167–215, Mar. 1952a.

LEBLOND, C. P.; CLERMONT, Y. DEFINITION OF THE STAGES OF THE CYCLE OF THE SEMINIFEROUS EPITHELIUM IN THE RAT. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 55, n. 4, p. 548–573, Nov. 1952b.

LEE, M. M. MIS Actions in the Developing Testis. **The Testis**, n. 4, p. 30–42, 2000.

LEE, V. W. et al. Variations in serum FSH, LH and testosterone levels in male rats from birth to sexual maturity. **Journal of reproduction and fertility**, v. 42, n. 1, p. 121–6, Jan. 1975.

LI, J.; AL-AZZAWI, F. Mechanism of androgen receptor action. **Maturitas**, v. 63, n. 2, p. 142–8, 20 Jun. 2009.

LI, L.; ZIRKIN, B. R.; PAPADOPOULOS, V. Leydig Cell Androgen Synthesis. **Encyclopedia of Reproduction**, v. 1, p. 215–221, 2018.

LIN, T. et al. Interleukin-1 inhibits cholesterol side-chain cleavage cytochrome P450

expression in primary cultures of leydig cells. **Endocrinology**, v. 129, n. 3, p. 1305–1311, 1991.

LORDING, D. W.; DE KRETZER, D. M. COMPARATIVE ULTRASTRUCTURAL AND HISTOCHEMICAL STUDIES OF THE INTERSTITIAL CELLS OF THE RAT TESTIS DURING FETAL AND POSTNATAL DEVELOPMENT. **Reproduction**, v. 29, n. 2, p. 261–269, 1 May 1972.

LÖSEL, R.; WEHLING, M. Nongenomic actions of steroid hormones. **Nature reviews. Molecular cell biology**, v. 4, n. 1, p. 46–56, Jan. 2003.

LOSS, E. S. et al. Testosterone modulates K(+)ATP channels in Sertoli cell membrane via the PLC-PIP2 pathway. **Horm Metab Res.**, v. 36, n. 8, p. 519–25, Aug. 2004.

LOVELAND, K. L.; HEDGER, M. P. **Activins and inhibins in Sertoli cell biology**. [s.l.] Elsevier Inc., 2015.

LUETJENS, C. M.; WEINBAUER, G. F. Testosterone: biosynthesis, transport, metabolism and (non-genomic) actions. n. May, p. 15–32, 2018.

LUKAS-CROISIER, C. et al. Follicle-stimulating hormone increases testicular Anti-Müllerian hormone (AMH) production through sertoli cell proliferation and a nonclassical cyclic adenosine 5'-monophosphate-mediated activation of the AMH Gene. **Molecular endocrinology (Baltimore, Md.)**, v. 17, n. 4, p. 550–61, 2 Apr. 2003.

MA, X.; HUANG, L.-G.; DONG, Q. Effects of ethane dimethane sulfonate on fetal Leydig cells in neonatal rats. **Beijing da xue xue bao. Yi xue ban = Journal of Peking University. Health sciences**, v. 45, n. 5, p. 770–3, 18 Oct. 2013.

MAJDIC, G.; MILLAR, M. R.; SAUNDERS, P. T. K. Immunolocalisation of androgen receptor to interstitial cells in fetal rat testes and to mesenchymal and epithelial cells of associated ducts. **Journal of Endocrinology**, v. 147, n. 2, p. 285–293, 1 Nov. 1995.

MAJDIC, G.; SAUNDERS, P. T. K.; TEERDS, K. J. Immunoeexpression of the Steroidogenic Enzymes 3-Beta Hydroxysteroid Dehydrogenase and 17  $\alpha$ -hydroxylase, C17,20 Lyase and the Receptor for Luteinizing Hormone (LH) in the Fetal Rat Testis Suggests That the Onset of Leydig Cell Steroid Production Is Indepen. **Biology of Reproduction**, v. 58, n. 2, p. 520–525, 1 Feb. 1998.

MARTHA PÉREZ-ARMENDARIZ, E. et al. Developmental regulation of connexin 43 expression in fetal mouse testicular cells. **The Anatomical Record**, v. 264, n. 3, p. 237–246, 1 Nov. 2001.

MATSUMOTO, T. et al. Androgen receptor functions in male and female physiology. **The Journal of steroid biochemistry and molecular biology**, v. 109, n. 3–5, p. 236–41, Apr. 2008.

MCCABE, M. et al. Claudin-11 and occludin are major contributors to Sertoli cell tight junction function, in vitro. **Asian Journal of Andrology**, v. 18, n. 4, p. 620, 2016.

MCEWAN, I. J.; SMITH, L. B. **Androgen receptor**. Second Edi ed. [s.l.] Elsevier, 2018. v. 1

MEACHEM, S. J. et al. Developmentally distinct in vivo effects of FSH on proliferation and apoptosis during testis maturation. **The Journal of endocrinology**, v. 186, n. 3, p. 429–46, 1 Sep. 2005.

MEANS, A. R. et al. Regulation of the testis sertoli cell by follicle stimulating hormone. **Annual review of physiology**, v. 42, p. 59–70, Jan. 1980.

MEHTA, P.; JOSHI, M.; SINGH, R. TGF- $\beta$  signaling in testicular development, spermatogenesis, and infertility. **Molecular Signaling in Spermatogenesis and Male Infertility**,

p. 105–115, 2019.

MENDIS-HANDAGAMA, S. M. L. C.; ARIYARATNE, H. B. S. Effects of thyroid hormones on Leydig cells in the postnatal testis. **Histology and Histopathology**, v. 19, n. 3, p. 985–997, 2004.

MERONI, S. B. et al. Molecular mechanisms and signaling pathways involved in Sertoli cell proliferation. **Frontiers in Endocrinology**, v. 10, n. MAR, p. 1–22, 2019.

MOK, K. W.; MRUK, D. D.; CHENG, C. Y. Regulation of blood-testis barrier (BTB) dynamics during spermatogenesis via the “Yin” and “Yang” effects of mammalian target of rapamycin complex 1 (mTORC1) and mTORC2. **International review of cell and molecular biology**, v. 301, p. 291–358, Jan. 2013.

MONSALVE, A.; BLAQUIER, J. A. Partial characterization of epididymal 5 $\alpha$  reductase in the rat. **Steroids**, v. 30, n. 1, p. 41–51, 1977.

MORALES, V. et al. Intratesticular Delivery of Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  and Ceramide Directly Abrogates Steroidogenic Acute Regulatory Protein Expression and Leydig Cell Steroidogenesis in Adult Rats. **Endocrinology**, v. 144, n. 11, p. 4763–4772, 2003.

NAMWANJE, M.; BROWN, C. W. Activins and inhibins: Roles in development, physiology, and disease. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 8, n. 7, p. 1–56, 2016.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL. **Guide for the Care and Use of Laboratory Animals**. Washington, DC: National Academies Press (US), 2011.

NEGRO-VILAR, A.; OJEDA, S. R.; MCCANN, S. M. Evidence for Changes in Sensitivity to Testosterone Negative Feedback on Gonadotropin Release During Sexual Development in the Male Rat. **Endocrinology**, v. 93, n. 3, p. 729–735, Sep. 1973.

NERI, R. et al. A biological profile of a nonsteroidal antiandrogen, sch 13521 (4'-nitro-3'-trifluoromethylisobutyranilide). **Endocrinology**, v. 91, n. 2, p. 427–437, 1972.

NOGUCHI, J. et al. Ontogeny of inhibin secretion in the rat testis: Secretion of inhibin-related proteins from fetal Leydig cells and of bioactive inhibin from Sertoli cells. **Journal of Endocrinology**, v. 155, n. 1, p. 27–34, 1997.

NOVI, A. M.; SABA, P. An electron microscopic study of the development of rat testis in the first 10 postnatal days. **Zeitschrift für Zellforschung und mikroskopische Anatomie (Vienna, Austria : 1948)**, v. 86, n. 3, p. 313–26, Jan. 1968.

NOZU, K. et al. Modulation of Leydig cell androgen biosynthesis and cytochrome P-450 levels during estrogen treatment and human chorionic gonadotropin-induced desensitization. **Journal of Biological Chemistry**, v. 256, n. 19, p. 10012–10017, 10 Oct. 1981.

NUCK, B. A.; LUCKY, A. W. Epitestosterone: a potential new antiandrogen. **J Invest Dermatol.**, v. 89, n. 2, p. 209–11, Aug. 1987.

O'DONNELL, L.; MCLACHLAN, R. I. **The role of testosterone in spermatogenesis**. [s.l.: s.n.].

O'SHAUGHNESSY, P. J. et al. Localization of 17 $\beta$ -Hydroxysteroid Dehydrogenase/17-Ketosteroid Reductase Isoform Expression in the Developing Mouse Testis—Androstenedione Is the Major Androgen Secreted by Fetal/Neonatal Leydig Cells 1. **Endocrinology**, v. 141, n. 7, p. 2631–2637, Jul. 2000.

O'SHAUGHNESSY, P. J.; MONTEIRO, A.; ABEL, M. Testicular development in mice lacking

receptors for follicle stimulating hormone and androgen. **PloS one**, v. 7, n. 4, p. e35136, Jan. 2012.

ODONNELL, L. et al. Endocrine Regulation of Spermatogenesis. In: **Knobil and Neill's Physiology of Reproduction**. 3. ed. St Louis: Elsevier, 2006. p. 1017–1069.

ODUWOLE, O. O.; PELTOKETO, H.; HUHTANIEMI, I. T. Role of Follicle-Stimulating Hormone in Spermatogenesis. **Frontiers in Endocrinology**, v. 9, n. December, p. 1–11, 2018.

OHYAMA, K. et al. Expression of anti-Müllerian hormone and its type II receptor in germ cells of maturing rat testis. **Endocrine Journal**, v. 62, n. 11, p. 997–1006, 9 Sep. 2015.

OHYAMA, K. et al. Stage-Specific Expression Profiles of Anti-Müllerian Hormone and its Type II Receptor in Germ Cells during Spermatogenic Cycle of Rats. **Journal of Steroids & Hormonal Science**, v. 08, n. 02, 2017.

OJEDA, S. R.; SKINNER, M. K. Puberty in the Rat. In: **Knobil and Neill's Physiology of Reproduction**. 3. ed. St Louis: Academic Press, 2006.

ORAFIDIYA, F. A.; MONAGHAN, A. E.; MCEWAN, I. J. **Androgen Receptor Ligands: Agonists and Antagonists**. Second Edi ed. [s.l.] Elsevier, 2018. v. 1

ORTH, J. M. Proliferation of Sertoli cells in fetal and postnatal rats: a quantitative autoradiographic study. **The Anatomical record**, v. 203, n. 4, p. 485–92, Aug. 1982.

ORTH, J. M. The role of follicle-stimulating hormone in controlling Sertoli cell proliferation in testes of fetal rats. **Endocrinology**, v. 115, n. 4, p. 1248–55, Oct. 1984.

ORTH, J. M.; HIGGINBOTHAM, C. A.; SALISBURY, R. L. Hemicastration causes and testosterone prevents enhanced uptake of [3H] thymidine by Sertoli cells in testes of immature rats. **Biology of reproduction**, v. 30, n. 1, p. 263–70, Feb. 1984.

PAKARINEN, P. et al. Differential response of luteinizing hormone receptor and steroidogenic enzyme gene expression to human chorionic gonadotropin stimulation in the neonatal and adult rat testis. **Endocrinology**, v. 127, n. 5, p. 2469–2474, 1990.

PARVINEN, M. Regulation of the Seminiferous Epithelium\*. **Endocrine Reviews**, v. 3, n. 4, p. 404–417, Oct. 1982.

PATRÃO, M. T. C. C.; SILVA, E. J. R.; AVELLAR, M. C. W. Androgens and the male reproductive tract: an overview of classical roles and current perspectives. **Arquivos brasileiros de endocrinologia e metabologia**, v. 53, n. 8, p. 934–45, Nov. 2009.

PAYNE, A. H. et al. HYPOTHALAMIC, PITUITARY AND TESTICULAR FUNCTION DURING SEXUAL MATURATION OF THE MALE RAT. **Journal of Endocrinology**, v. 72, n. 1, p. 17–26, 1 Jan. 1977.

PAYNE, A. H. Steroidogenic Enzymes in Leydig Cells. In: PAYNE, A. H.; HARDY, M. P. (Eds.). **The Leydig Cell in Health and Disease**. [s.l.] Springer, 2007.

PAYNE, A. H.; HALES, D. B. Overview of steroidogenic enzymes in the pathway from cholesterol to active steroid hormones. **Endocrine Reviews**, v. 25, n. 6, p. 947–970, 1 Jul. 2004.

PAZ, G. F. et al. Developmental pattern of  $\Delta 5$   $3\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase activity in isolated rat Leydig cells. **Steroids**, v. 36, n. 6, p. 661–674, Dec. 1980.

PAZOS, F. et al. Mechanisms of Reduced Body Growth in the Pubertal Feminized Male

Rat: Unbalanced Estrogen and Androgen Action on the Somatotrophic Axis. **Pediatric Research**, v. 48, n. 1, p. 96–103, 2000.

PELLETIER, R. M. The blood-testis barrier: The junctional permeability, the proteins and the lipids. **Progress in Histochemistry and Cytochemistry**, v. 46, n. 2, p. 49–127, 2011.

PEROBELLI, J. E. et al. Impairment on sperm quality and fertility of adult rats after antiandrogen exposure during prepuberty. **Reproductive Toxicology**, v. 33, n. 3, p. 308–315, 2012.

PEROBELLI, J. E. et al. Androgen deprivation from pre-puberty to peripuberty interferes in proteins expression in pubertal and adult rat epididymis. **Reproductive Toxicology**, v. 38, p. 65–71, Jul. 2013.

PICUT, C. A. et al. Postnatal Development of the Testis in the Rat: Morphologic Study and Correlation of Morphology to Neuroendocrine Parameters. **Toxicologic Pathology**, v. 43, n. 3, p. 326–342, 2015.

PICUT, C. A.; ZIEJEWSKI, M. K.; STANISLAUS, D. Comparative Aspects of Pre- and Postnatal Development of the Male Reproductive System. **Birth Defects Research**, v. 110, n. 3, p. 190–227, 15 Feb. 2018.

POINTIS, G. et al. Testicular connexin 43, a precocious molecular target for the effect of environmental toxicants on male fertility. **Spermatogenesis**, v. 1, n. 4, p. 303–317, 2011.

PREVOT, V. **Puberty in Mice and Rats**. Fourth Edi ed. [s.l.] Elsevier, 2015. v. 2

RACINE, C. et al. Receptors for anti-müllerian hormone on Leydig cells are responsible for its effects on steroidogenesis and cell differentiation. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 95, n. 2, p. 594–9, 20 Jan. 1998.

RAHMAN, F.; CHRISTIAN, H. C. Non-classical actions of testosterone: an update. **Trends in endocrinology and metabolism: TEM**, v. 18, n. 10, p. 371–8, Dec. 2007.

RAMOS, A. S.; DYM, M. Ultrastructural differentiation of rat Sertoli cells. **Biology of reproduction**, v. 21, n. 4, p. 909–22, Nov. 1979.

RANNIKKO, A. et al. Stage-specific expression of the FSH receptor gene in the prepubertal and adult rat seminiferous epithelium. **Journal of Endocrinology**, v. 151, n. 1, p. 29–35, 1996.

REBOURCET, D. et al. Sertoli cells control peritubular myoid cell fate and support adult Leydig cell development in the prepubertal testis. **Development (Cambridge, England)**, v. 141, n. 10, p. 2139–49, 1 May 2014.

REBOURCET, D. et al. Sertoli cell number defines and predicts germ and leydig cell population sizes in the adult mouse testis. **Endocrinology**, v. 158, n. 9, p. 2955–2969, 2017.

REBOURCET, D.; O'SHAUGHNESSY, P. J.; SMITH, L. B. The expanded roles of Sertoli cells: lessons from Sertoli cell ablation models. **Current Opinion in Endocrine and Metabolic Research**, v. 6, p. 42–48, Jun. 2019.

REY, R. The prepubertal testis: A quiescent or a silently active organ? **Histology and Histopathology**, v. 14, n. 3, p. 991–1000, 1999.

REY, R. A. et al. Ontogeny of the androgen receptor expression in the fetal and postnatal testis: its relevance on Sertoli cell maturation and the onset of adult spermatogenesis.

**Microscopy research and technique**, v. 72, n. 11, p. 787–95, Nov. 2009.

RHEES, R. W. et al. Effects of Prenatal Testosterone on Sexual Behavior, Reproductive Morphology and LH Secretion in the Female Rat. **Developmental Neuroscience**, v. 19, n. 5, p. 430–437, 1997.

RISBRIDGER, G.; KERR, J.; DE KRETZER, D. Differential Effects of the Destruction of Leydig Cells by Administration of Ethane Dimethane Sulphonate to Postnatal Rats1. **Biology of Reproduction**, v. 40, n. 4, p. 801–809, 1 Apr. 1989.

RISLEY, M. S. et al. Cell-, age- and stage-dependent distribution of connexin43 gap junctions in testes. **Journal of Cell Science**, 1992.

ROBERTS, K. P.; CHAUVIN, T. R. **Gene Regulation in the Epididymis**. Second Edi ed. [s.l.] Elsevier, 2018. v. 1

ROBERTS, K. P.; CHAUVIN, T. R. Molecular mechanisms of testosterone action on the testis. **Current Opinion in Endocrine and Metabolic Research**, v. 6, p. 29–33, 1 Jun. 2019.

ROUILLER-FABRE, V. et al. Effect of anti-Mullerian hormone on Sertoli and Leydig cell functions in fetal and immature rats. **Endocrinology**, v. 139, n. 3, p. 1213–1220, 1998.

RUSSELL, L. D. et al. Histological and Histopathological Evaluation of the Testis. **International Journal of Andrology**, v. 16, n. 1, p. 83–83, Feb. 1993.

SAHA, J. K. et al. Acute hyperglycemia induced by ketamine/xylazine anesthesia in rats: mechanisms and implications for preclinical models. **Experimental biology and medicine (Maywood, N.J.)**, v. 230, n. 10, p. 777–84, 1 Nov. 2005.

SANSONE, A. et al. AMH and INSL3 in testicular and extragonadal pathophysiology: what do we know? **Andrology**, v. 7, n. 2, p. 131–138, 2019.

SANTI, D. et al. Follicle-Stimulating Hormone (FSH) Action on Spermatogenesis: A Focus on Physiological and Therapeutic Roles. **Journal of Clinical Medicine**, v. 9, n. 4, p. 1014, 2020.

SAYERS, N.; HANYALOGLU, A. C. Intracellular Follicle-Stimulating Hormone Receptor Trafficking and Signaling. **Frontiers in Endocrinology**, v. 9, n. November, p. 1–12, 2018.

SCHULTZ, F. M.; WILSON, J. D. Virilization of the wolffian duct in the rat fetus by various androgens. **Endocrinology**, v. 94, n. 4, p. 979–986, 1974.

SENGUPTA, P.; ARAFA, M.; ELBARDISI, H. Hormonal regulation of spermatogenesis. In: SINGH, R. (Ed.). **Molecular Signaling in Spermatogenesis and Male Infertility**. Boca Raton : CRC Press, [2020]: CRC Press, 2019. p. 41–49.

SHAHA, C. Estrogens and Spermatogenesis. In: [s.l.: s.n.]. p. 42–64.

SHAN, L. X. Developmental changes in levels of luteinizing hormone receptor and androgen receptor in rat Leydig cells. **Endocrinology**, v. 131, n. 3, p. 1107–1114, 1992.

SHAN, L. X. et al. Differential regulation of steroidogenic enzymes during differentiation optimizes testosterone production by adult rat Leydig cells. **Endocrinology**, v. 133, n. 5, p. 2277–83, 1 Nov. 1993.

SHARPE, R. et al. Proliferation and functional maturation of Sertoli cells, and their relevance to disorders of testis function in adulthood. **Reproduction**, v. 125, n. 6, p. 769–784, 1 Jun. 2003.

SHARPE, R. M. Sertoli Cell Endocrinology and Signal Transduction: Androgen Regulation. In: SKINNER, M. K. et al. (Eds.). . **Sertoli Cell Biology**. [s.l.] Elsevier, 2005. p. 199–216.

SHIMA, Y. et al. Contribution of Leydig and Sertoli Cells to Testosterone Production in Mouse Fetal Testes. **Molecular Endocrinology**, v. 27, n. 1, p. 63–73, Jan. 2013.

SHULMAN, L. N. The Biology of Alkylating-Agent Cellular Injury. **Hematology/Oncology Clinics of North America**, v. 7, n. 2, p. 325–335, Apr. 1993.

SILVA, F. R. M. B.; LEITE, L. D.; WASSERMANN, G. F. Rapid signal transduction in Sertoli cells. **European journal of endocrinology / European Federation of Endocrine Societies**, v. 147, n. 3, p. 425–33, Sep. 2002.

SILVA, M. S. B.; GIACOBINI, P. New insights into anti-Müllerian hormone role in the hypothalamic–pituitary–gonadal axis and neuroendocrine development. **Cellular and Molecular Life Sciences**, n. 0123456789, 2020.

SIMARD, J. et al. Characteristics of interaction of the antiandrogen flutamide with the androgen receptor in various target tissues. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 44, n. 3, p. 261–270, 1986.

SIMONETTI, R. B. **Efeito do quelante de zinco na resposta eletrofisiológica da testosterona e do decanoato de nandrolona em células de Sertoli de ratos imaturos**. [s.l.] Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2017.

SIMONI, M.; GROMOLL, J.; NIESCHLAG, E. The follicle-stimulating hormone receptor: biochemistry, molecular biology, physiology, and pathophysiology. **Endocrine reviews**, v. 18, n. 6, p. 739–73, Dec. 1997.

SIRILARIYARATNE, H. B. Studies on the Onset of Leydig Precursor Cell Differentiation in the Prepubertal Rat Testis. **Biology of Reproduction**, v. 63, n. 1, p. 165–171, 1 Jul. 2000.

SMART, J. L. et al. Growth and development of male and female rats treated with the Leydig cell cytotoxin ethane dimethane sulphonate during the suckling period. **Food and Chemical Toxicology**, v. 28, n. 2, p. 121–128, Jan. 1990.

SMITH, L. B.; O'SHAUGHNESSY, P. J.; REBOURCET, D. Cell-specific ablation in the testis: what have we learned? **Andrology**, v. 3, n. 6, p. 1035–49, Nov. 2015.

SMITH, L. B.; WALKER, W. H. The regulation of spermatogenesis by androgens. **Seminars in Cell & Developmental Biology**, v. 30, p. 2–13, 2 Jun. 2014.

SRIRAMAN, V. et al. Müllerian inhibiting substance inhibits testosterone synthesis in adult rats. **Journal of Andrology**, v. 22, n. 5, p. 750–758, 2001.

ST-PIERRE, N. et al. Neonatal hypothyroidism alters the localization of gap junctional protein connexin 43 in the testis and messenger RNA levels in the epididymis of the rat. **Biology of reproduction**, v. 68, n. 4, p. 1232–40, 1 Apr. 2003.

STÁRKA, L. et al. Observations on the biological activity of epitestosterone. **Physiological research / Academia Scientiarum Bohemoslovaca**, v. 40, n. 3, p. 317–26, 1 Jan. 1991.

STÁRKA, L. Epitestosterone. **J Steroid Biochem Mol Biol**, v. 87, n. 1, p. 27–34, Oct. 2003.

STÁRKA, L.; BIČÍKOVÁ, M.; HAMPL, R. Epitestosterone—an endogenous antiandrogen? **Journal of Steroid Biochemistry**, v. 33, n. 5, p. 1019–1021, Nov. 1989.

STÁRKA, L.; BREUER, H. METABOLISM OF 14-14C-EPITESTOSTERONE IN THE RAT. **Acta Endocrinologica**, v. 56, n. 1\_Suppl, p. S133, Dec. 1967.

STOKER, T. E. et al. Endocrine-Disrupting Chemicals: Prepubertal Exposures and Effects on Sexual Maturation and Thyroid Function in the Male Rat. A Focus on the EDSTAC Recommendations. **Critical Reviews in Toxicology**, v. 30, n. 2, p. 197–252, 29 Jan. 2000.

SU, D.-M. et al. Influence of fetal Leydig cells on the development of adult Leydig cell population in rats. **Journal of Reproduction and Development**, v. 64, n. 3, p. 223–231, 2018.

SULLIVAN, R.; BELLEANNÉE, C. Cell Biology of the Epididymis. **Encyclopedia of Reproduction**, v. 1, p. 286–291, 2018.

SUMMERVILLE, J. W.; SCHWARTZ, N. B. Suppression of serum gonadotropin levels by testosterone and porcine follicular fluid in castrate male rats. **Endocrinology**, v. 109, n. 5, p. 1442–7, 1 Nov. 1981.

SUN, E. L.; FLICKINGER, C. J. Development of cell types and of regional differences in the postnatal rat epididymis. **American Journal of Anatomy**, v. 154, n. 1, p. 27–55, 1979.

SUTINEN, P.; MALINEN, M.; PALVIMO, J. J. Androgen Receptor. In: **Endocrinology of the Testis and Male Reproduction**. [s.l.: s.n.]. p. 395–416.

SWAN, S. H.; KRISTENSEN, D. M. **Anogenital distance: A marker of steroidal endocrine disruption**. Second Edi ed. [s.l.] Elsevier, 2018. v. 1

SZYMAŃSKA, K. et al. FSHR trans-activation and oligomerization. **Frontiers in Endocrinology**, v. 9, n. December, p. 1–12, 2018.

TAN, I. P. et al. Regulated assembly of connexin33 and connexin43 into rat Sertoli cell gap junctions. **Biology of Reproduction**, v. 54, n. 6, p. 1300–1310, 1996.

TAPANAINEN, J. et al. Rat testicular endogenous steroids and number of Leydig cells between the fetal period and sexual maturity. **Biology of reproduction**, v. 31, n. 5, p. 1027–35, Dec. 1984.

TEERDS, K.; RIJNTJES, E. Dynamics of Leydig Cell Regeneration After EDS. In: PAYNE, A.; HARDY, M. (Eds.). **The Leydig Cell in Health and Disease**. Contemporary Endocrinology. Totowa, NJ: Humana Press, 2007. p. 91–116.

TEIXEIRA, J. et al. Developmental expression of a candidate müllerian inhibiting substance type II receptor. **Endocrinology**, v. 137, n. 1, p. 160–165, Jan. 1996.

THOMAS, P. **Nongenomic Androgen Actions in Male Reproductive Tissues**. Second Edi ed. [s.l.] Elsevier, 2018. v. 1

THOMAS, P. et al. ZIP9, a novel membrane androgen receptor and zinc transporter protein. **General and Comparative Endocrinology**, v. 257, p. 130–136, 2018.

THOMAS, P. Membrane Androgen Receptors Unrelated to Nuclear Steroid Receptors. **Endocrinology**, v. 160, n. 4, p. 772–781, 2019.

TIMURKAAN, S.; GUR, F. M.; KARAN, M. Immunohistochemical distribution of androgen receptor in rat testis during postnatal development. **Revue de Medecine Veterinaire**, v. 163, n. 3, p. 112–115, 2012.

TRBOVICH, A. M. et al. Müllerian Inhibiting Substance lowers testosterone in luteinizing

hormone-stimulated rodents. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 98, n. 6, p. 3393–3397, 2001.

TURCHI, P. Prevalence, Definition, and Classification of Infertility. In: **Clinical Management of Male Infertility**. Cham: Springer International Publishing, 2015. p. 5–11.

UENO, S. et al. Cellular localization of mullerian inhibiting substance in the developing rat ovary. **Endocrinology**, v. 124, n. 2, p. 1000–1006, 1989.

URRUTIA, M.; GRINSPON, R. P.; REY, R. A. Comparing the role of anti-Müllerian hormone as a marker of FSH action in male and female fertility. **Expert Review of Endocrinology and Metabolism**, v. 14, n. 3, p. 203–214, 2019.

VALLI, H. et al. **Spermatogonial Stem Cells and Spermatogenesis**. [s.l.: s.n.]. v. 1

VAN DE WIJNGAART, D. J. et al. Androgen receptor coregulators: Recruitment via the coactivator binding groove. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 352, n. 1–2, p. 57–69, 2012.

VAN DEN DRIESCHE, S. et al. Relative importance of prenatal and postnatal androgen action in determining growth of the penis and anogenital distance in the rat before, during and after puberty. **International journal of andrology**, v. 34, n. 6 Pt 2, p. e578-86, Dec. 2011.

VAN HAASTER, L. H. et al. High neonatal triiodothyronine levels reduce the period of Sertoli cell proliferation and accelerate tubular lumen formation in the rat testis, and increase serum inhibin levels. **Endocrinology**, v. 133, n. 2, p. 755–60, 1 Aug. 1993.

VERHOEVEN, G.; CAILLEAU, J. Follicle-Stimulating Hormone and Androgens Increase the Concentration of the Androgen Receptor in Sertoli Cells\*. **Endocrinology**, v. 122, n. 4, p. 1541–1550, Apr. 1988.

VIGER, R. S.; ROBAIRE, B. Expression of 4-ene steroid 5 alpha-reductase messenger ribonucleic acid in the rat epididymis during postnatal development. **Endocrinology**, v. 131, n. 3, p. 1534–1540, Sep. 1992.

VIGER, R. S.; ROBAIRE, B. Immunocytochemical localization of 4-ene steroid 5 alpha-reductase type 1 along the rat epididymis during postnatal development. **Endocrinology**, v. 134, n. 5, p. 2298–2306, May 1994.

VIGER, R. S.; ROBAIRE, B. Steady state steroid 5 alpha-reductase messenger ribonucleic acid levels and immunocytochemical localization of the type 1 protein in the rat testis during postnatal development. **Endocrinology**, v. 136, n. 12, p. 5409–5415, Dec. 1995.

VIGUIER-MARTINEZ, M. C. et al. Effect of a non-steroidal antiandrogen, flutamide, on the hypothalamo-pituitary axis, genital tract and testis in growing male rats: endocrinological and histological data. **Acta Endocrinologica**, v. 102, n. 2, p. 299–306, Feb. 1983.

VIHKO, K. K. et al. Expression of Testicular Messenger Ribonucleic Acid for Luteinizing Hormone Receptor in the Rat: Developmental Regulation of Multiple Transcripts during Postnatal Life<sup>1</sup>. **Biology of Reproduction**, v. 46, n. 6, p. 1016–1020, 1 Jun. 1992.

VON LEDEBUR, E. I. C. F. et al. Rapid effect of testosterone on rat Sertoli cell membrane potential. Relationship with K<sup>+</sup>ATP channels. **Horm Metab Res.**, v. 34, n. 10, p. 550–5, Oct. 2002.

WALCZAK-JEDRZEJOWSKA, R. et al. Administration of testosterone inhibits initiation of seminal tubule growth and decreases Sertoli cell number in the earliest period of rat's postnatal

development. **Folia Histochemica et Cytobiologica**, v. 47, n. 5, p. 149–154, 14 Jan. 2010.

WALCZAK-JEDRZEJOWSKA, R. et al. Testosterone and oestradiol in concert protect seminiferous tubule maturation against inhibition by GnRH-antagonist. **International journal of andrology**, v. 34, n. 5 Pt 2, p. e378-85, Oct. 2011.

WALKER, W. H. Molecular mechanisms of testosterone action in spermatogenesis. **Steroids**, v. 74, n. 7, p. 602–7, Jul. 2009.

WALKER, W. H. Non-classical actions of testosterone and spermatogenesis. **Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.**, v. 365, n. 1546, p. 1557–69, 27 May 2010.

WARREN, D.; DUFAU, M.; CATT, K. Hormonal regulation of gonadotropin receptors and steroidogenesis in cultured fetal rat tests. **Science**, v. 218, n. 4570, p. 375–377, 22 Oct. 1982.

WARREN, D. W. et al. Ontogeny of gonadotropin receptors in the fetal and neonatal rat testis. **Endocrinology**, v. 114, n. 2, p. 470–476, Feb. 1984.

WEIDER, K. et al. Altered differentiation and clustering of Sertoli cells in transgenic mice showing a Sertoli cell specific knockout of the connexin 43 gene. **Differentiation**, v. 82, n. 1, p. 38–49, Jul. 2011.

WEISSER, J. et al. Steroidogenesis and steroidogenic gene expression in postnatal fetal rat Leydig cells. **Molecular and cellular endocrinology**, v. 341, n. 1–2, p. 18–24, 20 Jul. 2011.

WELSH, M. et al. Identification in rats of a programming window for reproductive tract masculinization, disruption of which leads to hypospadias and cryptorchidism. **Journal of Clinical Investigation**, v. 118, n. 4, p. 1479–1490, 2008.

WELSH, M. J.; WIEBE, J. P. Sertoli Cell Capacity to Metabolize C 19 Steroids: Variation with Age and the Effect of Follicle-Stimulating Hormone\*. **Endocrinology**, v. 103, n. 3, p. 838–844, Sep. 1978.

WEN, Q.; CHENG, C. Y.; LIU, Y.-X. Development, function and fate of fetal Leydig cells. **Seminars in Cell & Developmental Biology**, 8 Mar. 2016.

WENIGER, J.; CHOURAQUI, J.; ZEIS, A. Production of estradiol by the fetal rat testis. **Reproduction Nutrition Development**, v. 33, n. 2, p. 121–127, 1993.

WENIGER, J. P.; ZEIS, A. Stimulation of aromatase activity in the fetal rat gonads by cAMP and FSH. **Acta Endocrinologica**, v. 119, n. 3, p. 381–385, 1988.

WILKENFELD, S. R.; LIN, C.; FRIGO, D. E. Communication between genomic and non-genomic signaling events coordinate steroid hormone actions. **Steroids**, v. 133, p. 2–7, 1 May 2018.

WILLEMS, A. et al. Selective ablation of the androgen receptor in mouse sertoli cells affects sertoli cell maturation, barrier formation and cytoskeletal development. **PLoS one**, v. 5, n. 11, p. e14168, Jan. 2010.

WILSON, J.; GEORGE, F.; GRIFFIN, J. The hormonal control of sexual development. **Science**, v. 211, n. 4488, p. 1278–1284, 20 Mar. 1981.

WU, S. et al. Crosstalk between Sertoli and Germ Cells in Male Fertility. **Trends in Molecular Medicine**, v. 26, n. 2, p. 215–231, 2020.

WU, M. V; SHAH, N. M. Control of masculinization of the brain and behavior. **Current**

**Opinion in Neurobiology**, v. 21, n. 1, p. 116–123, Feb. 2011.

WU, X. et al. Pubertal and adult leydig cell function in mullerian inhibiting substance-deficient mice. **Endocrinology**, v. 146, n. 2, p. 589–595, 2005.

XU, H.-Y. et al. Regulation of anti-Müllerian hormone (AMH) in males and the associations of serum AMH with the disorders of male fertility. **Asian Journal of Andrology**, v. 21, n. 2, p. 109, 2019.

XU, Q. et al. Infertility with defective spermatogenesis and steroidogenesis in male mice lacking androgen receptor in Leydig cells. **Endocrine**, v. 32, n. 1, p. 96–106, 7 Nov. 2007.

ZHANG, F. P. et al. Ontogeny of luteinizing hormone receptor gene expression in the rat testis. **Endocrinology**, v. 134, n. 5, p. 2206–2213, 1994.

ZHOU, B.; WATTS, L. M.; HUTSON, J. M. Germ Cell Development in Neonatal Mouse Testes in Vitro Requires Müllerian Inhibiting Substance. **Journal of Urology**, v. 150, n. 2 Part 2, p. 613–616, Aug. 1993.

## ANEXOS

### EDS

O EDS (Etano-1,2-dimetilsulfonato) é um agente alquilante que promove a apoptose das células de Leydig (JACKSON; JACKSON, 1984). Agentes alquilantes formam ligações cruzadas com os filamentos de DNA comprometendo a integridade e a replicação destes filamentos e resultando em morte celular (SHULMAN, 1993). Ao contrário de outros agentes alquilantes, como o busulfam que são citotóxicos a outras células, a citotoxicidade do EDS é específica para as células de Leydig (ref).

Embora seja alvo de diversos estudos, com abordagens tanto *in vivo* como *in vitro*, o mecanismo exato pelo qual o EDS promove a apoptose das células de Leydig ainda é desconhecido. Entretanto, a degeneração das células de Leydig observada em animais imaturos e adultos, em decorrência do EDS, segue o mesmo padrão: fragmentação e degeneração celular seguidas de fagocitose por macrófagos presentes no tecido intersticial (KERR; RISBRIDGER; KNELL, 1988).

Poucas horas após a administração de EDS observa-se aumento da expressão de proteínas pro-apoptóticas, como a caspase-3 (KIM; LUO; ZIRKIN, 2000), alterações nucleares características de apoptose, como condensação da cromatina e fragmentação nuclear (TEERDS; RIJNTJES, 2007), alterações nas organelas envolvidas na síntese de hormônios esteroides (KERR; BARTLETT; DONACHIE, 1986), redução da expressão de LHR e das enzimas STAR e 3B-HSD e aumento de IL-1 e TNF- $\alpha$  (BARKHA, 2015). TNF- $\alpha$  e IL-1 são citocinas pró-inflamatórias secretadas por macrófagos, as quais inibem a expressão de enzimas esteroideogênicas, como STAR, P450<sub>scc</sub> e P450<sub>c17</sub> (HALES, 1992; LIN et al., 1991; MORALES et al., 2003).

Estudos realizados por Kerr (1998), Risbridger (1989) e seus colaboradores avaliaram o efeito da exposição ao EDS (120 mg/kg – dose única) em ratos no 5º dpn. A análise morfológica do tecido revelou ausência de células de Leydig intactas, 24 horas após a exposição ao EDS. Foram observadas células de Leydig em vários estágios de degeneração sendo muitas destas células fagocitadas por macrófagos. Dois dias após a administração do EDS, as células de Leydig desaparecem do tecido. A apoptose das células de Leydig fetais é acompanhada pela redução da concentração sérica e testicular de testosterona (KERR; RISBRIDGER; KNELL, 1988;

RISBRIDGER; KERR; DE KRETZER, 1989). Entretanto, com o desenvolvimento dos testículos, as células de Leydig adultas iniciam sua diferenciação. No 14º dpn, os túbulos seminíferos dos filhotes que receberam EDS apresentam algumas células com formato fusiforme, semelhantes às células de Leydig progenitoras, com marcação positiva para LHR, 3B-HSD e 17B-HSD (SU et al., 2018). No 21º dpn observa-se um aumento no número destas células (KERR; RISBRIDGER; KNELL, 1988). Tanto o peso testicular como a concentração sérica de testosterona diminuem após a exposição ao EDS, mantendo-se reduzidos no 14º dpn. Entretanto, no 21º dpn, com a diferenciação das células de Leydig progenitoras, atingem valores semelhantes aos do grupo controle (KERR; RISBRIDGER; KNELL, 1988; SU et al., 2018).

Além do efeito direto do EDS nas células de Leydig, ocorrem também alterações no desenvolvimento de outros tecidos, como próstata, epidídimo, rins, adrenais, fígado, baço e coração, em decorrência da privação aos andrógenos (INOUE; BABA; MOROHASHI, 2018; JACKSON; MORRIS, 1977; KERR; RISBRIDGER; KNELL, 1988; SMART et al., 1990).

Trabalhos desenvolvidos por pesquisadores chineses avaliaram o efeito de diferentes doses de EDS (75, 100 e 125 mg/kg) em ratos neonatos. Todos os animais expostos ao EDS tiveram a concentração sérica de testosterona reduzido. Nos animais que receberam as doses de 100 e 125 mg/kg observou-se uma redução do peso testicular e da relação peso testicular/peso corporal e ausência de células de Leydig fetais (células 3B-HSD positivas) 4 dias após a exposição ao EDS. Uma redução do peso corporal e da taxa de sobrevivência foi observada somente nos filhotes expostos à dose de 125 mg/kg de EDS (MA; HUANG; DONG, 2013; SU et al., 2018). Com base nestes resultados, conclui-se que a dose de 100 mg/kg é a mais eficiente, em ratos neonatos, eliminando do tecido as células de Leydig com o menor dano ao animal (SU et al., 2018).

Em suma, a administração de dose única de EDS (100 mg/kg) a ratos neonatos elimina a produção de testosterona endógena em 24 horas e mantém seu efeito por 3-8 semanas sem provocar outros danos aos animais (KERR; RISBRIDGER; KNELL, 1988; MA; HUANG; DONG, 2013; RISBRIDGER; KERR; DE KRETZER, 1989; SU et al., 2018). Desta forma, este modelo parece ser a melhor forma para estudar as ações dos andrógenos, uma vez que os antagonistas do GnRH suprimem a liberação do LH, mas não inibem completamente os andrógenos testiculares e ainda reduzem a secreção de FSH (SMITH; O'SHAUGHNESSY; REBOURCET, 2015; TEERDS; RIJNTJES, 2007).